



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Avaliação da expressão de mediadores imunitários em gatos infectados com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) e tratados com interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω)

Carla Sofia Ramos Alves Sirage

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

2014

Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Avaliação da expressão de mediadores imunitários em gatos infectados com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) e tratados com interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω)

Carla Sofia Ramos Alves Sirage

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Vergílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

2014

Lisboa

DEDICO este trabalho ao meu querido marido por acreditar e tornar
o meu sonho realidade...

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação encerra um longo ciclo de estudos que culmina com a realização de um dos meus maiores sonhos, ser médica veterinária.

Para isso tenho de agradecer à minha família destacando o meu Marido que desde sempre acreditou em mim e nas minhas capacidades, mesmo quando eu não acreditava, à minha Mãe, Irmã e Cunhados, aos meus Padrinhos e Sogros pelo carinho, força e apoio que sempre me deram. Agradeço aos meus gatinhos, Lucky e Ciara e a todos os animais, seres tão especiais, é por vocês este esforço e será o meu futuro poder-vos ajudar a viver uma vida cada vez melhor.

Não posso deixar de agradecer ao Dr. Radiguett de la Bastille da clínica veterinária, Crêt de la Neige, St. Genis – França, por me ter dado a oportunidade de estagiar enquanto assistente veterinária, fazendo assim despertar o meu sonho de criança, dando-me coragem para iniciar um novo ciclo de 6 anos até ser médica veterinária.

Agradeço a toda a equipa da clínica do Refúgio da Bicharada, especificamente à Dr.^a Carla Guerra, dando-me desde 2009 a oportunidade de aprender a prática veterinária e o contacto diário com os desafios dos casos clínicos reais.

Agradeço ao Doutor Rodolfo Leal pela sua dedicação e, companheirismo e por todo o auxílio e conhecimento que me transmitiu. Agradeço também à Professora Doutora Solange Gil pela oportunidade dada para a realização deste projeto, pela sua pronta disponibilidade, dedicação, e simpatia facilitando assim a realização do mesmo. Agradeço ainda ao Professor Doutor Luís Tavares, à Virbac Portugal, à União Zoófila de Lisboa e ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal por tornarem possível a realização deste projeto.

RESUMO

Avaliação da expressão de mediadores imunitários em gatos infectados com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) e tratados com interferão ômega recombinante felino (rFeIFN- ω)

O interferão ômega felino (rFeIFN- ω) é atualmente o único interferão licenciado para uso médico-veterinário tendo-se mostrado eficaz no tratamento de gatos infectados pelo FeLV: melhora o seu estado clínico, prolonga a sua longevidade e reduz a excreção de vírus concomitantes. Contudo, o efeito do rFeIFN- ω como antiviral tem sido questionado, acreditando-se que este fármaco atue apenas ao nível da imunidade inata. Resultados publicados pelo nosso grupo reforçam esta teoria, reportando um aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda, indicadores indiretos de uma estimulação da imunidade inata.

Com vista a clarificar as propriedades imunomoduladoras do rFeIFN- ω , este estudo visa avaliar o efeito deste fármaco na expressão de diferentes citocinas (IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL12p40, IFN e TNF α) na expressão da proteína MX em gatos naturalmente infectados com FeLV.

Seis (6) gatos FeLV-positivos foram tratados com rFeIFN- ω segundo o protocolo licenciado (três (3) ciclos de cinco (5) injeções subcutâneas 1MU/kg aos dias 0 – 14 - 60). Antes do início do tratamento (D0) e no seu término (D65), os animais foram sujeitos a colheitas de sangue para avaliação da expressão relativa de citocinas e da proteína Mx por PCR em tempo real.

Dois dos seis (2/6) gatos expressaram IL1 β , IL6, IL12p40 ao D0 e três dos seis (3/6) ao D65 (2 decresceram expressão e 1 apresentou valor residual apenas no final do tratamento). Quatro de seis (4/6) expressaram IL4 ao D0, decrescendo para valores não quantificáveis ao D65 e um de seis (1/6) expressou TNF α ao D0. Por conseguinte, dois de seis (2/6) ao D65 (um (1) decresceu expressão e um (1) apresentou valor residual apenas no final do tratamento). Apenas um (1) gato expressou IFN ao D0 e a IL10 não revelou expressão.

Assim, comparando o D0 com o D65, apesar de parecer ter havido uma tendência decrescente da expressão das citocinas medidas, não se verificaram alterações significativas. A quantificação relativa da expressão da proteína Mx também não revelou alterações estatisticamente significativas entre o D0 e D65. Este estudo sugere que apesar do rFeIFN- ω induzir uma melhoria clínica significativa dos animais tratados, a sua acção advém sobretudo de uma estimulação da imunidade inata e não de uma acção directa sob a expressão de citocinas.

Palavras-Chave: vírus da leucemia felina; vírus da imunodeficiência felina; interferão ômega recombinante felino (rFeIFN- ω).

ABSTRACT

The feline omega interferon (rFeIFN- ω) is currently the only licensed interferon for use in veterinary medicine effective in the treatment of cats infected with FeLV: improving their clinical status, prolonging their life and reducing excretion of concomitant virus. However, the effect of ω -rFeIFN as an antiviral agent has been questioned, and it is believed that this drug acts only in innate immunity. Results published by our group support this theory, reporting an increase in serum levels of acute phase proteins, indirect indicators innate immunity stimulation.

To clarify the immunomodulatory properties of ω -rFeIFN, this study aimed to evaluate the effect of this drug on the expression of different cytokines (IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL12p40, IFN and TNF α) Mx protein in cats naturally infected with FeLV.

Six (6) FeLV-infected cats were treated with ω -rFeIFN according to the licensed protocol (three (3) cycles of five (5) subcutaneous injections 1MU/kg on days 0 – 14 - 60). Before the start of treatment (D0) and its end (D65), the animals were subjected to blood samples collection for evaluation of the relative cytokine expression by real time PCR.

Two out of six (2/6) cats expressed IL1 β , IL6 and IL12p40 to D0 and three out of six (3/6) to D65 (2 decreased and 1 demonstrated residual values only at the end of treatment). Four out of six (4/6) expressed IL4 to D0, decreasing to undetectable values on D65 and one out of six (1/6) expressed TNF α on D0. Further, two out of six (2/6) on D65 (one (1) decreased the expression and in one (1) residual values were demonstrated only at the end of treatment). Only one (1) cat expressed IFN no D0 and IL10 revealed no expression.

When comparing D0 with the D65, although both cytokines appeared to show a tendency to decrease expression, there were no significant modifications detected of measured. Relative quantification of the expression of Mx protein also revealed no statistically significant changes between D0 and D65. This study suggests that although the ω -rFeIFN induced a significant clinical improvement of treated cats, his action derived mainly from stimulation of innate immunity and not from a direct action on cytokine expression.

Keywords: feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, feline recombinant interferon omega (ω -rFeIFN).

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

O trabalho relacionado com esta dissertação foi apresentado sob a forma de poster no VIII Congresso da OMV (Ordem dos médicos veterinários) e IV Encontro de Formação, encontrando-se disponível em anexo.

S.Sirage, R.Leal, S.Gil, L.Tavares. “Avaliação da expressão de citocinas em gatos infectados com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) tratados com interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω). Presented and published on the CD proceedings of the IV Encontro de Formação Gratuita/ VIII Congresso OMV, 30th November – 1st December 2013, Lisbon, Portugal.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. Estágio Curricular – Trabalho Laboratorial	1
2. Introdução ao Estudo	3
3. Objetivos	5
ESTADO DA ARTE	6
1. Leucemia vírica Felina e Imunodeficiência Felina	6
2. Características do Vírus da Leucemia Felina (FeLV)	7
2.1 Classificação e Morfologia do FeLV	7
2.2 Estrutura genômica do FeLV	8
2.3 Proteínas virais e propriedades biológicas.....	9
2.3.1 Proteínas do envelope	9
2.3.2 Proteínas da cápside	10
2.4 Ciclo Replicativo.....	11
2.5 Epidemiologia.....	13
2.5.1 Distribuição e prevalência	13
2.5.2 Transmissão	13
2.6 Patogenia	14
2.6.1 Infecção por FeLV	14
2.6.2 Sinais Clínicos.....	17
2.6.3 Resposta Imunitária	18
3. Diagnóstico.....	19
4. Prevenção	20
5. Tratamento	21
5.1 Imunomoduladores não específicos	21
5.1.2 Glucocorticóides	21
5.1.3 Extratos de bactérias e probióticos	22
5.1.4 Proteínas virais imunoestimulantes	22
5.1.5 Linfócitos T imunomoduladores (LTCl)	22
5.2 Fitoterapia.....	23
5.3 Terapêutica Antiviral.....	24
5.3.1 AZT - Zidovudina	24
5.3.2 Ribavirin.....	25
5.3.3 Zalcitabine.....	25

5.3.4 Foscarnet	25
5.4 Interferão	26
5.4.1 Interferão alfa recombinante Humano (rHeIFN- α)	27
5.4.2 Interferão ómega recombinante felino ω (rFeIFN- ω)	28
5.5 Tratamento utilizado durante o estágio no “CHUVA – Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d’Alfort”	29
5.5.1 Gestão dos gatos assintomáticos	29
5.5.2 Terapêutica sintomática	30
5.5.3 Terapêutica antiviral	30
5.5.4 Tratamento imunomodulador	31
5.5.5 Tratamento da anemia	32
Materiais e Métodos	33
1. Desenho Experimental	33
2. Amostra Populacional	33
3. Plano terapêutico	33
4. Plano de Colheita Amostras	33
5. Processamento das Amostras	34
6. Primers e Ciclos de Amplificação de PCR utilizados no FeLV	34
7. Análise Estatística	36
8. Resultados	36
8.1 Caracterização da amostra populacional	36
8.2 Sinais Clínicos	37
8.3 Resultados Hematológicos e Proteinograma	38
8.4 Resultados da expressão de citocinas	39
8.5 Resultados proteína Mx	41
9. Discussão	42
10. Conclusões Finais	48
BIBLIOGRAFIA	49
ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Áreas e funções executadas durante o estágio ERASMUS na École Nationale Vétérinaire d'Alfort – Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort.....	1
Tabela 2: Estádios da infecção pelo FeLV (Hartmann K, 2012).....	16
Tabela 3: Sinais clínicos e principais mecanismos patológicos do FeLV(Hartmann K, 2012).....	18
Tabela 4: Androgénios utilizados no tratamento da Anemia.....	32
Tabela 5: Primers utilizados para avaliação da expressão de citocinas através do Real-Time qPCR em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω	35
Tabela 6: Primers e sonda utilizados para avaliação da expressão da Proteína MX através do Real-Time qPCR em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω	35
Tabela 7: Pontuação clínica – escala usada para classificação clínica em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω	37
Tabela 8: Pontuação clínica para cada parâmetro avaliado em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω	38
Tabela 9: Quantificação da expressão relativa da proteína Mx.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Formação do FeLV e integração na célula hospedeira (Adaptado: Greene, 2004).	12
Figura 2: Produção e libertação do vírus de uma célula felina maligna. A Replicação do vírus também pode ocorrer em células não malignas. FOCMA, antígeno de membrana associado ao oncornavírus Felino (Adaptado: Greene, 2004).	12
Figura 3: Processo temporal da infecção pelo FeLV	14
Figura 4: Resultados dos testes ELISA e IF em função do estado de virémia do animal	20
Figura 5: Sob ataque viral, as células CD4+ não amadurecem, não produzem IL-2 e interferão, e consequentemente, não conseguem estimular as células CD8+. Esta imunossupressão pode ser ultrapassada pelo tratamento com LTCI (Gingerich D., 2008).....	23
Figura 6: Acemannan, extraído da planta Aloé Vera: Endostim®.....	24
Figura 7: rFeIFN- ω - Virbagen® Omega/ Ciclos Terapêuticos	33
Figura 8: Dias de colheita das amostras.....	34
Figura 9: Resposta imunitária via complexo Th1 complexo Th2.....	Figura 10: Resposta Imunitária via 45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 e Gráfico 2: Quantificação Relativa da Expressão da IL-1 e IL-4 respectivamente.....	40
Gráfico 3 e Gráfico 4: Quantificação Relativa da Expressão da IL-6 e IL-12 respectivamente. ..	40
Gráfico 5 e Gráfico 6: Quantificação Relativa da Expressão de IFN e TNF- α respectivamente. .	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCD – The European Advisory Board on Cat Disease

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

AZT- Zidovudina

BID – Duas vezes ao dia

CA- Cápside

CHUVA- Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d’Alfort

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay

Env- Enveloppe

EPO- Eritropoietina

EUA- Estados Unidos da América

FAIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Felina

FeLV- Vírus da Leucemia Felina

FeLV⁺ - FeLV positivo

FIV- Vírus da Imunodeficiência Felina

FIV⁺ - FIV positivo

FIV/FeLV⁺ - Positivo para FIV e FeLV

FMV- Faculdade Medicina Veterinária

FOCMA- Feline Oncornavirus-associated Cell- Membrane Antigene

Gag- Group Associated Gene

g- Grama

GM-CSF- Factor estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos

Gp- Glicoproteína

GSA- Grup Specific Antigen

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

IF- Imunofluorescência

IFN- Interferão

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina
IM- Via Intramuscular
IN- Integrase
IP- Intraperitoneal
LTR- Long terminal repeats
Kg- Quilograma
MA- Matriz Proteica
M-CSF- Factor de estimulação da colónia dos macrófagos
MHCI- Complexo de histocompatibilidade de classe I
mg- miligrama
N.º - Número
ml- mililitro
NC- Nucleocápside
NK- Natural killer
nm- Nanómetros
OMV- Ordem dos médicos veterinários
p- proteína
PIF- Peritonite infecciosa felina
UI- Unidade Internacional
UM- Milhões de Unidades
UL- Universidade de Lisboa
UZL- União Zoófila de Lisboa
ORF- Open Reading Frame
Pb- Pares de Bases
PBS- Solução Salina Fosfatada
PCR- Polymerase Chain Reaction
PO- per os, via oral
Pol- Polymerase
PR- Protease
PTs- Proteínas totais
qPCR- Quantitative polymerase chain reaction
rFeIFN- ω - Interferão ómega recombinante Felino
rHeIFN- α - Interferão alfa recombinante Humano

Rh-EPO- Eritropoietina recombinante humana

rhGM-CSF - Factor recombinante humano estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos

RNA- Ácido Ribonucleico

RNAm-RNA mensageiro

RT- Transcriptase Reversa

RT-PCR- Transcriptase Reversa - Polymerase Chain Reaction

SI- Sistema imunitário

SIFN- Sistema interferão

SID- Uma vez ao dia

SC- Via subcutânea

SNC- Sistema Nervoso Central

SU- Glicoproteína de superfície

TNF- α - Factor de Necrose Tumoral alfa

μg – micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS

ω - Ómega® - Marca registada

β - Beta

α – Alfa

γ – Gamma

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

% - Percentagem

INTRODUÇÃO

1. Estágio Curricular – Trabalho Laboratorial

O presente estágio curricular está dividido em dois períodos, o primeiro período decorreu nos Laboratórios de Virologia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária-Universidade de Lisboa, do dia 16 de Julho de 2013 a 13 de Setembro de 2013, sob a orientação científica da Prof.^a Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil e co-orientação do Prof. Doutor Luís Manuel Morgado Tavares. Nestes laboratórios tive a oportunidade de colaborar, no estudo em curso sobre avaliação da expressão de citocinas em gatos infectados com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) e tratados com interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω). Durante este período executei os procedimentos necessários à realização do presente trabalho de dissertação e todos os procedimentos laboratoriais executados que se encontram descritos na presente dissertação.

O segundo período decorreu do dia 20 de Setembro de 2013 ao dia 20 de Dezembro de 2013 na “École Nationale Vétérinaire d'Alfort - Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort”, durante o qual tive a possibilidade de observar boas práticas clínicas, desenvolver o raciocínio crítico e científico e executar uma série de atividades que me desenvolveram competências em diversas áreas clínicas. Participei ativamente nas consultas e no serviço de hospitalização onde prestei os cuidados necessários aos animais que se encontravam internados, executando vários procedimentos médicos descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Áreas e funções executadas durante o estágio ERASMUS na École Nationale Vétérinaire d'Alfort – Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort

Data/Horas	Área	Funções Executadas
120h	Internamento de Medicina, de Cirurgia e do Departamento de Infecto-contagiosas	Execução do exame clínico do animal. Apresentação do caso clínico e discussão. Preparação e administração de fármacos. Colheita de sangue e venopunção para colocação de cateteres. Observação de esfregaços sanguíneos e análise de urina. Execução de relatórios. Monitorização e tratamento de 2 gatos infectados com Peritonite infecciosa felina (PIF).

40h	Receção e Farmácia	Atendimento a clientes.
60h	Cuidados Intensivos	Funções idênticas às executadas no internamento. Execução de algaliações, toracocenteses, lavagens vesicais, enemas, oxigénio terapia, entre outros.
40h	Imagiologia	Descrição e avaliação de radiografias. Execução de relatórios. Assistência a ecografias. Preparação dos animais e execução de radiografias.
36h	Consultas Especialidade: NAC, Reabilitação funcional,	Execução do exame clínico do animal. Apresentação do caso clínico e discussão. Execução dos exames complementares de diagnóstico. como: Colheita de sangue e venopunção para colocação de cateteres, observação de esfregaços sanguíneos e análise de urina, participação em ecografias e radiografias.
36h	Consultas Cirurgia	Funções idênticas às executadas em consultas de especialidade.
30h	Cirurgia	Execução do protocolo anestésico Administração dos fármacos Execução de orquiectomias e ovariectomias felinas
40h	Cirurgia Geral	Execução do exame clínico do animal pré-cirurgia Preparação e assepsia do campo cirúrgico Participação nas cirurgias (Laminectomia lombar, laminectomia cervical, Ovariectomia, ablação do conduto auditivo, ablação do membro posterior, cesariana felina e canídea com a respectiva reanimação das crias).

72h	Consultas Medicina Interna, Neurologia, Dermatologia e Cardiologia	<p>Execução do exame clínico do animal.</p> <p>Apresentação do caso clínico e discussão</p> <p>Execução dos exames complementares de diagnóstico como:</p> <p>Colheita de sangue e venopunção para colocação de cateteres, observação de esfregaços sanguíneos e análise de urina, testes dermatológicos</p> <p>Assistência a ecocardiografias</p> <p>Elaboração de receitas</p> <p>Tratamento de 2 gatos FeLV com rFeIFN-ω Virbagen® Omega, com o protocolo licenciado mencionado nesta dissertação</p>
40h	Anestesiologia	<p>Elaboração do protocolo anestésico do animal</p> <p>Preparação dos fármacos e administração</p> <p>Monitorização do animal durante a cirurgia e pós-operatório</p> <p>Elaboração de relatórios</p>
60h	Urgências	<p>Execução do exame clínico do animal.</p> <p>Apresentação do caso clínico e discussão</p> <p>Execução dos exames complementares de diagnóstico como:</p> <p>Colheita de sangue e venopunção para colocação de cateteres, observação de esfregaços sanguíneos e análise de urina.</p> <p>Elaboração de relatórios</p>
Total: 574h		

2. Introdução ao Estudo

O presente trabalho completa o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa, tendo como objectivo avaliar a expressão imunitária em gatos infectados com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) tratados com interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω).

O Interferão é uma citocina com propriedades imunomoduladoras, particularmente relevantes em infeções virais. Clonado pela primeira vez em 1992, o interferão ómega felino (rFeIFN- ω) é atualmente o único interferão licenciado para uso médico-veterinário. Apesar de poucos estudos suportarem o seu uso, o rFeIFN- ω tem-se mostrado eficaz no tratamento de gatos infectados pelo

vírus da leucemia felina (FeLV), melhorando o seu estado clínico, prolongando a sua longevidade e reduzindo a excreção de vírus concomitantes como herpes vírus, coronavírus e calicivírus. Contudo, o efeito do rFeIFN- ω como agente antiviral tem sido questionado, acreditando-se que este fármaco atue apenas ao nível da imunidade inata. Resultados publicados pelo nosso grupo reforçam esta teoria, reportando um aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda, as quais são indicadores indiretos de uma estimulação da imunidade inata (Leal, 2013).

As respostas do sistema imunitário podem ser divididas em imunidade não específica (inata), presente desde o nascimento do animal e imunidade específica (adquirida), a qual se desenvolve após o nascimento e em consequência de um estímulo antigénico específico sendo também designada como imunidade adaptativa (Kennedy, 2010). A imunidade não específica diz respeito a mecanismos inatos, constituindo uma primeira linha de defesa contra doenças infecciosas e se for eficaz pode mesmo eliminar o agente antes do sistema imunitário ter oportunidade de desenvolver uma resposta de imunidade adquirida. A imunidade adquirida é principalmente liderada por linfócitos, células específicas com capacidade de reconhecimento e memória, com especial relevância para as respostas celular e humoral (Kennedy, 2010; Pedersen, et al, 1998). As respostas celular e humoral são mediadas pelas células T helper CD4+, respectivamente Th1(imunidade celular) e Th2 (imunidade humoral) (Kennedy, 2010). Os diferentes componentes do sistema imunitário interagem entre si para desencadear uma resposta imunitária competente. Esta interacção envolve a produção e libertação de diferentes citocinas que, sendo os mediadores da resposta imunitária, têm funções distintas, tais como a estimulação do crescimento e multiplicação celular exponencial, a diferenciação, a migração, a reparação e ativação de vias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, etc. (Day MJ, 2012; Kennedy, 2010; Pedersen, et al, 1998; Roitt & Delves, 2001; Tizard, 2009b).

A proteína Mx, é considerada como um biomarcador específico do IFN tipo I (Bracklein et al., 2006), possuindo propriedades antivirais e GTPase específicas, sendo expressa em diferentes células, tais como hepatócitos, células endoteliais e células do sistema imunitário (PBMCs, células dendríticas e células mielóides), (Fernandez et al, 1999 ; Horisberger et al, 1990; Sadler e Williams, 2008).

3. Objetivos

Com vista a clarificar as propriedades imunomoduladoras do rFeIFN- ω , este estudo teve como objetivo avaliar o efeito deste fármaco na expressão de diferentes citocinas (IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL12p40, IFN e TNF α) e proteína Mx em gatos naturalmente infectados com FeLV.

ESTADO DA ARTE

1. Leucemia vírica Felina e Imunodeficiência Felina

As doenças causadas por retrovírus como a leucemia vírica felina (FeLV) e a imunodeficiência vírica felina (FIV), representam uma importante causa de morbilidade e mortalidade em gatos domésticos, sendo consideradas as doenças infecciosas mais comuns nesta espécie em todo o mundo, pondo em risco o bem-estar e a vida destes animais (Hartmann K, 2012).

O retrovírus mais conhecido é o vírus da imunodeficiência humana (HIV) agente do síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) humano. Ambos os vírus felinos são transmitidos por contacto direto entre os animais sendo, no caso do vírus da leucemia felina, o contacto com a saliva a via de transmissão mais frequente, nomeadamente pela partilha de recipientes para alimentação e bebida e a ocorrência de mordeduras. Tanto o FeLV como o FIV são responsáveis por provocar depressão do sistema imunitário envolvendo sinais clínicos semelhantes. Estes correspondem a infecções respiratórias, intestinais ou cutâneas, anemia e desenvolvimento de tumores, sendo que, com o desenvolvimento da doença, aparecem sinais gerais tais como anorexia, febre, letargia e desidratação. A confirmação do diagnóstico do FeLV é normalmente feita através da pesquisa do antígeno viral p27 no sangue e no caso do FIV através da detecção de anticorpos específicos no soro do animal suspeito (A Moraillon, 2000).

Os retrovírus felinos encontram-se disseminados por todo o mundo podendo afectar até 44% dos gatos dependendo da região geográfica, da densidade felina local e do estilo de vida de cada animal (Cohn, 2006; Couto, 2003; Kahn, 2007).

O FIV pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae* e ao género *Lentivirus* (Sellon & Hartmann, 2006) enquanto o FeLV partilha com este a família e sub-família mas pertence ao género *Gammaretrovirus* (Pepin et al, 2007; Levy et al., 2008). Em classificação taxonómica anterior (actualmente ultrapassada) consideravam-se três sub-famílias de retrovírus, designadas de *Oncovirinae*, *Lentivirinae* e *Spumavirinae* respectivamente por provocarem neoplasias, por desencadear infecções crónicas de evolução lenta, e por conferirem um aspecto espumoso às culturas de células infectadas (Jarrett, 1999).

De uma forma geral os gatos jovens tem uma maior probabilidade de se tornarem persistentemente infectados em relação aos adultos. Uma vez infectados com FeLV 30% a 50% dos gatos tornam-se persistentemente virémicos e desenvolvem doença clínica após um período assintomático. Uma vez desenvolvidos os sinais clínicos 80% dos gatos infectados morrem em 2 a 3 anos (Mari et al., 2004).

Após um longo período de incubação estes vírus estabelecem infecções persistentes nos hospedeiros o que frequentemente conduz a doenças graves na maioria das vezes fatais, (Jarrett, 1999) tendo a capacidade de infectar todas as células hematopoiéticas da medula óssea e tecidos linfóides resultando numa anemia aplásica, leucopénia e trombocitopénia. A imunodeficiência induzida pelo FeLV leva a consequências para estes animais tais como anorexia severa, caquexia, fraqueza progressiva e múltiplas infecções oportunistas. Dentro destas a coinfeção por FIV é das mais letais uma vez que exacerba a imunodeficiência. Esta coinfeção pode ocorrer em cerca de 7% dos gatos infectados por FeLV. A infecção por FIV em gatos susceptíveis frequentemente tem uma evolução subclínica semelhante à da infeção por FeLV. No entanto gatos co-infectados FIV/FeLV tem um mau prognóstico já que estes 2 retrovírus podem afectar todas as linhagens de células hematopoiéticas e linfóides (Mari et al., 2004).

O FeLV sobrevive no hospedeiro desencadeando uma supressão imunitária, que leva os antígenos virais a um estado de anergia ou imunotolerância. Além disso, uma das maiores características que distingue o FeLV dos outros retrovírus, encontra-se no facto de que os gatos expostos ao vírus podem recuperar e tornarem-se não virémicos. Por sua vez o FIV apresenta uma estrutura genómica mais complexa que inclui além dos 3 genes principais, genes responsáveis por manter o vírus num estado latente evitando a sua eliminação face a uma resposta imunitária. Existem também retrovírus menos patogénicos que são os vários elementos retrovirais endógenos, transmitidos geneticamente de uma forma silenciosa nas células da linha germinativa em todos os gatos (Jarrett, 1999).

2. Características do Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

2.1 Classificação e Morfologia do FeLV

O FeLV é um vírus de genoma RNA de sinal positivo, mede aproximadamente 110 nm de diâmetro e o seu genoma constituído por duas cópias de RNA+ encontra-se contido por um core icosaédrico envolvido pelo envelope derivado da célula hospedeira (A Moraillon, 2000; Neil, 2008). Pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae* e ao género *Gammaretrovirus*. Os vírus da família *Retroviridae* são caracterizados por possuírem a capacidade de, uma vez na célula hospedeira e após descapsidação, desenvolver uma cópia de DNA complementar a partir do RNA viral através da enzima transcriptase reversa (RT). Esta cópia de DNA do genoma é em seguida integrada no genoma da célula hospedeira, como provírus (através da função integrase da RT). Este processo é essencial ao ciclo de vida de todos os retrovírus e constitui a base da persistência viral que caracteriza a infecção (Jarrett, 1999).

Os vírus desta família também estão associados a um fenómeno de latência, após a integração do genoma viral na célula hospedeira (Hoffmann-Lehmann, R. et al. 2001).

O envelope externo de base lipoproteica originado a partir da membrana citoplasmática da célula hospedeira contém ainda glicoproteínas de origem viral, a glicoproteína gp70 com peso molecular de 70 kDa, considerada como principal antígeno do envelope, e a proteína transmembranar p15E, de 15 kDa de peso molecular.

A matriz proteica situada a nível interno é constituída por proteínas p12 com peso molecular de 12kDa. A matriz envolve a nucleocápside icosaédrica, com diâmetro de 75nm. A nucleocapside é constituída por duas cópias de RNA viral, protegido, por uma cápside icosaédrica constituída principalmente pela proteína p27 e ainda pelas proteínas p10 e p15.

2.2 Estrutura genómica do FeLV

A estrutura genómica dos retrovírus é bastante similar entre eles possuindo 3 genes segundo a orientação 5'-3': *gag-pol-env* que codificam respectivamente as proteínas estruturais do core do virião (*gag*), as enzimas responsáveis pela replicação e integração do vírus (*pol*) e as proteínas do envelope (*env*) (Jarrett,1999).

1. O gene *gag* “*Group Associated Gene*”, constitui uma região de 2kbases codificando uma poliproteína que, uma vez fragmentada, dá origem às proteínas estruturais do virião, p10, p12, p15C e p27. É o gene mais conservado do genoma do FeLV.
2. O gene *pol* “*Polymerase*” constitui uma região de 3kbases codificando a enzima transcriptase reversa que, através das suas diversas funções enzimáticas, polimerase de DNA, RNase e integrase é responsável pela replicação e integração do vírus no genoma da célula hospedeira.
3. O gene *env* “*Envelope*” constitui uma região de 3kbases codificando os precursores dos compostos virais do envelope externo que serão glicosilados e clivados para formar uma glicoproteína de superfície, a gp70 e uma proteína transmembranária, a p15E (Hosie, 2007; Rojko, 1984).

A estrutura genómica do FeLV é mais simples que a do FIV já que não possui genes de regulação adicionais como acontece no FIV e nos outros lentivírus. Como descrito anteriormente, o core ou nucleocápside do virião é constituído por proteínas de diferentes pesos moleculares, entre elas a p27, com especial relevância para o diagnóstico, pois trata-se do antígeno pesquisado nos testes serológicos, existindo em abundância no plasma e citoplasma das células infectadas. Das

proteínas do envelope a gp70 e a p15E, também possuem uma importância acrescida, a gp70 no que diz respeito à infecção uma vez que esta é responsável pela interação específica do vírus com o receptor celular (adsorção), eu precede a penetração do vírus na célula, e sendo também responsável por definir o espectro de sensibilidade celular do vírus *in vitro*; no que diz respeito à imunidade, os anticorpos neutralizantes são dirigidos contra esta estrutura; Variações a nível da gp70 permitem ainda a distinção de 3 subgrupos A, B e C que é determinada pela sequência de aminoácidos no local de união com o receptor celular (A Moraillon, 2000). A ligação da glicoproteína de superfície gp70, indutora da formação de anticorpos neutralizantes, (Ettinger, 2005) à membrana celular da célula do hospedeiro é realizada pela proteína transmembranária p15E (Couto, 2003).

O genoma viral é ladeado nos dois extremos por sequências de bases nucleotídicas repetidas não codificantes designadas por LTRs “Long Terminal Repeats”, que desempenham funções reguladoras da expressão e replicação viral, tendo um papel fundamental como promotor da iniciação e amplificação da transcrição dos genes provirais (Hartmann, 2006; Levy, 2008). Esta sequência é composta por bases únicas designadas U5 em 5' e U3 em 3' e bases redundantes designadas R (Levy, 2008).

De referir ainda a existência dos retrovírus endógenos, de transmissão vertical e identificados no genoma dos gatos domésticos não infectados (Horzinek *et al.*, 2007) que incluem sequências homólogas ao FeLV, que se encontram estavelmente integradas no genoma celular, agindo como qualquer outro gene celular (Jarrett, 1999). São sequências de genes virais, não patogénicas, normalmente presentes no genoma felino, incapazes de produzir partículas virais infecciosas. Estes vírus endógenos deverão ter resultado de infecções retrovirais ancestrais que tendo integrado o genoma das células da linha germinal passaram a ser constituintes do próprio genoma da espécie. Segundo alguns autores podem ocorrer recombinações genéticas entre o DNA destes vírus endógenos e o provírus do FeLV exógeno e deste modo aumentar a sua patogenicidade (Hartmann, 2006).

2.3 Proteínas virais e propriedades biológicas

2.3.1 Proteínas do envelope

A Gp 70 é o principal antígeno de superfície, sendo necessária para a adsorção da partícula do vírus à membrana celular da célula hospedeira. Possui um papel fundamental uma vez que os epítomos deste antígeno são capazes de induzir uma resposta imunitária específica. Os anticorpos sero-neutralizantes reagem com o local de ligação da gp70, impedindo a ligação do vírus à célula

hospedeira e como tal prevenindo a infecção.

O FeLV classifica-se em 4 subgrupos de transcendência clínica (Kahn, 2007), designados de A, B, C e T de acordo com o polimorfismo dos receptores da glicoproteína gp70 do envelope viral (Linenberger, 1999). Estes subgrupos variam morfologicamente mas, apresentam semelhanças antigénicas e estão imunologicamente relacionados (Horzinek *et al.*, 2007). O subgrupo A é predominante, encontra-se sempre presente e é antigenicamente estável, sendo o menos patogénico (Hartmann, 2004; Neil, 1999). Replica-se apenas em condições naturais, nas células de felinos e garante a transmissão entre estes, a indução da virémia e a infecção latente (Huisman *et al.* 1998). Os subgrupos B, C e T, derivam do subgrupo A através de mutações e / ou recombinações. As virémias persistentes são consequência da infecção pelo FeLV-A, em 50% dos casos, consequência de uma combinação entre o FeLV-A e B, em 49% dos casos, e em 1% dos casos, devido a uma combinação entre FeLV-A e C, ou entre FeLV-A e B. O subgrupo T tem a particularidade de ter um tropismo preferencialmente dirigido para as células T (Cheng, *et al.* 2007). Estes subgrupos determinam a infeciosidade, a patogenicidade, a capacidade de resposta e a estimulação da resposta imunitária sero-neutralizante por parte do animal, tendo também a capacidade de influenciar a natureza e a gravidade de qualquer doença induzida pelo FeLV (Rojko, 1984).

A p15E, é uma proteína termoestável, indutora da imunossupressão. As suas propriedades imunossupressoras estimulam o crescimento tumoral e reduzem a resposta imunitária contra o FOCMA (Feline Oncornavirus-associated Cell- Membrane Antigene). O seu modo de ação é dirigido contra os linfócitos T helper diminuindo a sua actividade. Esta proteína diminui ainda a expressão da interleucina 2 (IL-2) assim como a receptividade das células competentes a esta interleucina.

2.3.2 Proteínas da cápside

2.3.2.1 Proteínas da estrutura interna

O FeLV é um *Gammaretrovírus* composto por quatro proteínas na sua estrutura interna, já mencionadas anteriormente: p27, p15C, p12 e p10. Sendo que esta última está fortemente ligada ao DNA viral (Hardy, 1983).

As proteínas da estrutura interna do FeLV são produzidas em abundância no citoplasma das células infetadas. A maior parte não é incorporada nas partículas virais e permanecem na célula, ou dispersam-se no plasma. Estas proteínas constituem assim os antígenos que são detetáveis pelos métodos de diagnóstico, como o método de imunofluorescência indireta (IFI) no citoplasma

das células infetadas (neutrófilos e plaquetas circulantes), ELISA (ensaio imunoenzimático) em meio extracelular (sangue, plasma,). A presença do antígeno de FeLV numa célula é sempre indicativo que a célula produz o vírus infeccioso (Hardy, 1981).

A proteína p27 é o antígeno principal da nucleocápside, sendo designada por GSA -Group Specific Antigen. A maioria dos testes de detecção abaixo descritos é baseada na detecção deste antígeno.

As outras proteínas do núcleo não desempenham um papel muito importante, no entanto, estão envolvidas na formação de complexos imunes precipitantes nos glomérulos renais, podendo causar glomerulonefrites (Hardy, 1981).

2.3.2.2 Proteínas enzimáticas

A enzima transcriptase reversa (RT) também designada por DNA polimerase RNA dependente, permite a transcrição do RNA viral de cadeia simples numa única cadeia de DNA complementar (Hardy, 1981), sendo necessária na síntese de provírus, no início da replicação viral e para a possível transformação da célula hospedeira. Outras enzimas virais estão envolvidas nas sucessivas fases de replicação viral. A DNA-polimerase permite a conversão de DNA de cadeia simples em DNA de dupla cadeia ou em provírus. As endonucleases e ligases permitem a integração do provírus no genoma celular. Os anticorpos dirigidos contra a polimerase inibem a replicação do FeLV e diminuem a progressão da infeção in vivo (Jacquemin, 1978).

2.3.2.3 FOCMA

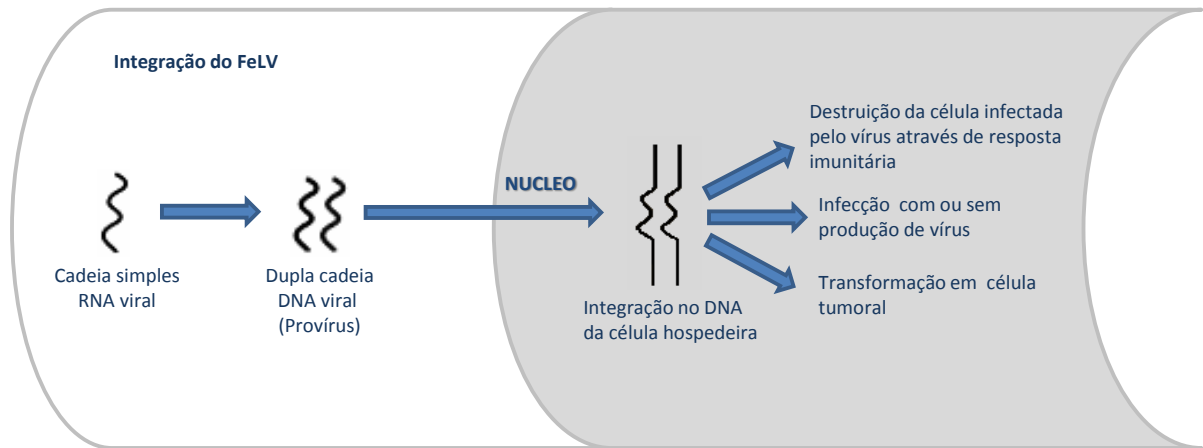
Este neoantígeno de membrana expressa-se na superfície das células hematopoiéticas e linfóides que sofreram transformação neoplásica como resultado de uma infeção viral (Thiry, 2002). Contudo este antígeno tem sido objecto de alguma controvérsia sendo por vários autores considerado que se trata apenas da glicoproteína gp70 expressa à superfície das células infetadas.

2.4 Ciclo Replicativo

As partículas virais ligam-se aos receptores das células hospedeiras através das glicoproteínas do envelope o que permite a sua entrada na célula (Hartmann, 2011). O genoma viral é libertado para o interior da célula hospedeira, a transcriptase reversa permite a transcrição do RNA viral em DNA complementar que é integrado no genoma da célula hospedeira, por intermédio da função enzimática integrase, passando a ser designado por provírus (Hartmann, 2006) que por sua vez irá servir como molde para a formação de novas partículas virais (figura 1). A divisão da célula conduz à transcrição dos genes provirais com a produção de proteínas e RNA viral (Willett, 2012). Posteriormente, ocorre a libertação do vírus por extrusão dos cores através da membrana

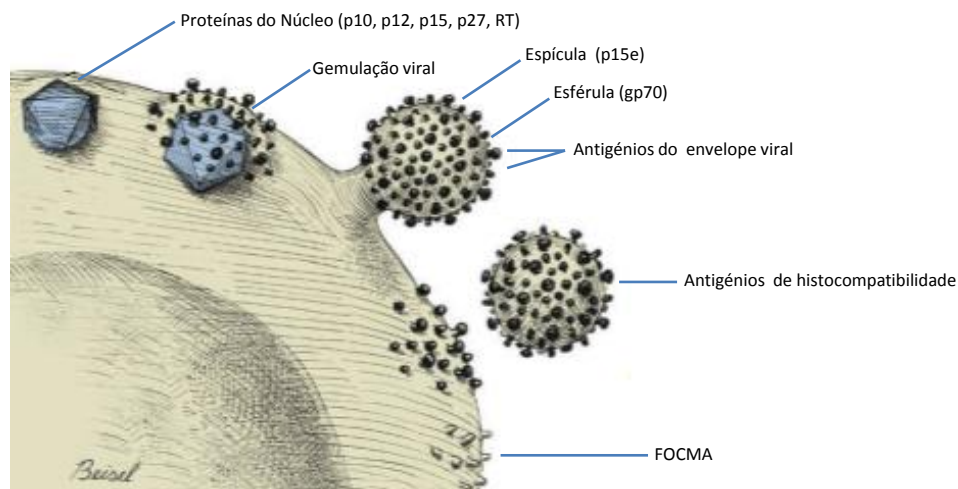
celular (gemulação ou “budding”), sem que ocorra necessariamente a destruição da célula hospedeira, (figura 2) (Horzinek, 2007).

Figura 1 - Formação do FeLV e integração na célula hospedeira (Adaptado: Greene, 2004).



As células que possuem DNA proviral no seu genoma são consideradas persistentemente infectadas, além de o transmitirem à sua descendência (A. Moraillon, 2000). O FeLV pode levar imediatamente à formação de novos viriões (A. Moraillon, 2000), ou manter-se inativo, isto é, em fase de latência, não havendo produção de partículas virais, pelo que o sistema imunitário do animal infectado não detecta a sua presença (Dunham & Graham, 2008).

Figura 2: Produção e libertação do vírus de uma célula felina maligna. A Replicação do vírus também pode ocorrer em células não malignas. FOCMA, antígeno de membrana associado ao oncornavírus Felino (Adaptado: Greene, 2004).



2.5 Epidemiologia

2.5.1 Distribuição e prevalência

A incidência da infecção por FeLV está diretamente relacionada com a densidade da população felina e o estilo de vida dos animais. A prevalência em gatos saudáveis estima-se em cerca de 2-5% (2,3%, de acordo com um estudo recente na América do Norte) mas é particularmente mais elevada nos gatos doentes (11,3-19,4%, dependendo do país segundo Levy J, et al, 2008; Sykes J, 2009) e entre 15 e 20%, dependendo das fontes (Hosie et al, 2007).. Nas comunidades sem controlo à entrada de gatos virémicos, a prevalência pode ser superior a 20% (Hosie et al, 2007). Nos últimos 25 anos, a prevalência e a importância da infecção por FeLV na Europa diminuiu significativamente com o uso de testes de detecção de confiança e vacinas mais eficazes (Hosie et al, 2007; Levy J, 2000).

2.5.2 Transmissão

A vida em comunidades com um elevado número de indivíduos é o principal factor no que diz respeito à transmissão, seguido dos factores que contribuem para o contacto entre os indivíduos, tais como, animais não esterilizados que vivem no exterior, a partilha de água e alimento, são alguns dos factores de risco (Hosie et al, 2007).

Nos gatos infectados com FeLV os produtos virulentos consistem nas secreções e excreções sobretudo a saliva mas também as lágrimas, , fezes, urina e leite. A excreção viral resulta da infecção dos epitélios que também ocorre no período assintomático da doença, isto é, em animais aparentemente saudáveis e sem sinais clínicos, mas infectados pelo vírus. De lembrar também que a reativação do vírus em estado de latência pode ser acompanhada pela re-excreção viral. Os principais factores de susceptibilidade são a idade, a estirpe viral, o modo de infecção, a quantidade de vírus a que o animal é exposto e a duração do período de exposição à infecção. A idade é o principal factor de resistência, os animais jovens (especialmente com menos de 4 meses) são muito mais susceptíveis que os adultos (A. Moraillon, 2000). A média de idade dos gatos FeLV positivos é 3-4 anos.

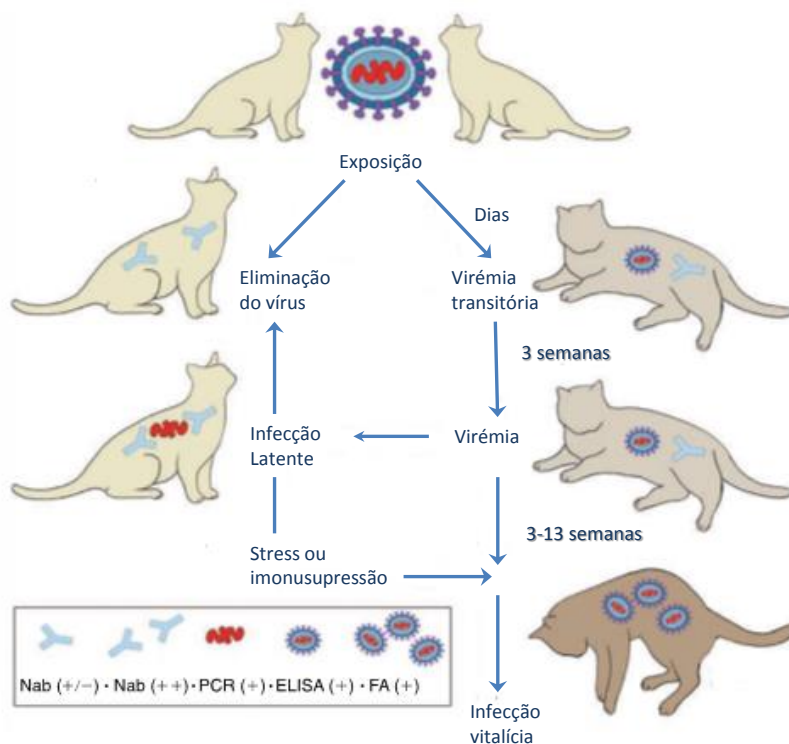
O FeLV é transmitido horizontalmente ou por contacto direto entre os gatos, ou por contacto indireto através da saliva e ou urina infectada com o vírus (Gomes-Keller et al, 2009). A transmissão da infecção às crias através do leite materno é uma outra forma de contaminação horizontal. A transmissão vertical no útero leva à morte fetal (por reabsorção ou aborto) ou ao nascimento de crias infectadas. A transmissão vertical através dos gâmetas não ocorre (A Moraillon, 2000).

2.6 Patogenia

2.6.1 Infecção por FeLV

O FeLV para se multiplicar necessita de células em divisão, o que explica o facto de a infecção ser limitada aos tecidos hematopoiéticos e epitélios do organismo do animal. Ao contrário do que acontece noutras doenças virais, as células infectadas não são lisadas, podendo continuar a produzir o vírus por longos períodos de tempo. A inoculação viral ocorre principalmente por via oronasal ou através de feridas resultantes de mordeduras (Gomes-Keller et al, 2006; Collado et al, 2007), a replicação viral inicia-se no tecido linfóide da cabeça e do pescoço (A Moraillon, 2000), inicialmente na oro faringe, principalmente nos linfócitos e macrófagos das amígdalas (Dunham & Granham, 2008). Em seguida, ocorre a virémia primária estendendo a infecção a outros órgãos linfóides e medula óssea, onde o vírus encontra condições ideais de replicação. Se os mecanismos de defesa forem insuficientes para conterem a infecção ocorre a fase de virémia secundária que estende a infecção aos epitélios nomeadamente às glândulas salivares de onde resulta que as secreções e excreções (saliva, lágrimas, , fezes, urina, leite) contenham partículas virais capazes de infectar outros gatos (figura 3).

Figura 3: Processo temporal da infecção pelo FeLV



Legenda: Nab – Anticorpo (AC) neutralizante, PCR – Polymarized Chain Reaction, ELISA – Enzyme-linked immunosorbant assay, FA – AC com fluorescência. (Adaptado: Greene, 2004).

Está descrita uma nova classificação, na qual as fases de infecção por FeLV são definidas como infecção abortiva, infecção regressiva ("virémia transitória" seguida por "infecção latente"), infecção progressiva ("virémia persistente") e por fim infecção atípica ou focal.

Infecção abortiva: Após a infecção, o vírus começa inicialmente a replicar-se no tecido linfóide local, na região orofaríngea. Em alguns gatos imunocompetentes, a replicação viral pode ser interrompida por uma resposta imunitária humoral e celular eficaz, sendo que estes gatos nunca se tornam virémicos. Estes possuem elevados níveis de anticorpos neutralizantes. Não são detectados no sangue antígenos contra o FeLV, RNA ou DNA viral. Esta infecção é provavelmente causada quando o gato é exposto a doses baixas do FeLV (Hartmann, 2012).

A **Infecção Regressiva** desenvolve-se após uma resposta imunitária eficaz. Na infecção regressiva, a replicação viral e a virémia ocorrem antes ou logo após a infecção da medula óssea. Após a infecção inicial, a replicação do FeLV espalha-se sistemicamente através das células mononucleares (linfócitos e monócitos). Durante esta fase, os gatos têm resultados positivos em testes que detectam o antígeno livre no plasma (por exemplo, ELISA). O vírus é excretado principalmente através da saliva. Em gatos com infecção regressiva, esta virémia tende a terminar dentro de algumas semanas ou meses ("virémia transitória"). Após cerca de três semanas de virémia as células da medula óssea tornam-se infectadas, infectando as células precursoras hematopoiéticas. Apesar das células da medula óssea estarem infectadas, uma percentagem dos gatos é capaz de erradicar a virémia, contudo não conseguem eliminar o vírus completamente do organismo. Esta situação era anteriormente designada por "Infecção Latente". A base molecular de "latência" consiste na integração de uma cópia do genoma viral (provírus) no DNA cromossómico celular. Embora o DNA proviral esteja presente no genoma celular, não está nenhum vírus a ser ativamente produzido. Assim, os gatos com infecção regressiva apresentam resultados negativos em todos os testes que usam a detecção do antígeno FeLV. Durante a divisão celular, o DNA proviral é replicado e as informações são transmitidas às células filhas. No entanto, o DNA proviral não é traduzido em proteínas, e não são produzidas partículas de vírus infecciosas. Portanto, os gatos com infecção regressiva não excretam o FeLV e não parecem ser infecciosos para os outros gatos.

Através da técnica de PCR podem-se detectar provírus no sangue de gatos com infecção regressiva que são antígeno-negativos. Num estudo realizado na Suíça, foi demonstrado que, para além dos gatos antígeno-positivos e provírus-positivos, cerca de 10 % da população de gatos com resultados negativos para antígenos foram positivos para DNA proviral no sangue

(Hofmann-Lehmann, 2001). A infecção regressiva pode ser reativada porque a informação para a produção de partículas virais está presente e podem, potencialmente, ser reutilizadas quando há uma diminuição na produção de anticorpos (por exemplo , depois de uma imunossupressão).

Em gatos com **Infecção Progressiva** ocorre uma extensa replicação viral, primeiro no tecido linfóide, seguido pela medula óssea, tecido epitelial e mucosas. Progressivamente os gatos infectados permanecem persistentemente virémicos, tornando-se portadores do vírus para toda a vida, esta condição era anteriormente designada de “virémia persistente”, sendo atualmente classificada como infecção progressiva. Os gatos com este tipo de infecção desenvolvem doenças associadas ao FeLV, e a maioria acaba por morrer em poucos anos. As infecções regressiva e progressiva podem ser distinguidas através da repetição de testes de pesquisa do antígeno viral no sangue periférico. Os gatos com infecção regressiva podem voltar a ficar negativos, aos testes, o mais tardar após 16 semanas da infecção, enquanto que os gatos com infecção progressiva mantêm-se positivos. Inicialmente ambas as infecções (progressiva e regressiva) são acompanhadas pela persistência de DNA proviral do FeLV no sangue, detectado pela técnica de PCR, mas posteriormente estão associadas a diferentes cargas virais do FeLV quando medidos através do método “Real-Time quantitative polymerase chain reaction” (RT-PCR), sendo que a infecção regressiva está associada a níveis baixos e a infecção progressiva a níveis elevados do FeLV (Torres, 2005; Pepin, 2007).

Infecções focais ou infecções atípicas têm sido descritas mas são raras em gatos naturalmente infectados com FeLV. São caracterizadas por um local de replicação atípico como a glândula mamária, a bexiga ou o globo ocular. Esta replicação pode levar à produção intermitente: ou de um baixo grau de antígenos, e, por conseguinte, estes gatos podem ter resultados positivos fracos ou discordantes nos testes de pesquisa de antígenos; ou os resultados positivos e negativos podem-se alternar (Levy, 2008).

Tabela 2: Estádios da infecção pelo FeLV (Hartmann K, 2012)

Estádios da infecção por FeLV	Antígeno p27 no sangue	Cultura do vírus no sangue	RNA Viral no sangue	DNA viral no sangue	Cultura de tecido viral	Excreção viral	Doenças Associadas ao FeLV
Progressiva	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Provável
Regressiva	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Improvável
Abortiva	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Improvável
Focal/Atípica	Variável	Variável	Variável	Variável	Positivo	Variável	Improvável

2.6.2 Sinais Clínicos

Como sinais clínicos, consecutivos à infecção por FeLV, estão incluídos o desenvolvimento de tumores, sobretudo linfoma ou leucemia, anemia não regenerativa, afecção da medula óssea (mieloptise, mielodisplasia ou mielofibrose), problemas neurológicos (anisocoria) e reprodutivos, doença gastrointestinal, imunossupressão e infecções oportunistas devido à afecção da medula óssea ou doenças imunomediadas.

Os gatos infectados podem desenvolver linfopénia, atrofia do timo e depleção dos linfócitos. A desregulação na produção de células T CD4⁺ contribui para o decréscimo da resposta imunitária, humoral e celular levando a infecções oportunistas como infecções bacterianas do trato urinário inferior e superior, hemoparasitas, infecções do trato respiratório, PIF-Peritonite Infecciosa Felina e estomatites crónicas (Sykes J, 2010).

A consequência clínica mais importante é a imunossupressão. A imunossupressão pode conduzir a doenças infecciosas secundárias que representam a maioria dos sinais clínicos, mas também pode levar a uma diminuição dos mecanismos de defesa tumoral, causando um aumento do risco de desenvolvimento de tumores. É importante perceber que muitas destas doenças secundárias ao FeLV e também ao FIV, são tratáveis. Os mecanismos que levam a imunossupressão são diferentes para as duas infecções. Muitos gatos infectados pelo FeLV têm infecções bacterianas, virais, protozoárias e fúngicas, mas existem poucos estudos controlados comprovando que estes gatos têm uma maior taxa de infecção comparando com os gatos FeLV negativos. Assim, embora o FeLV tenha certamente a capacidade de supressão do sistema imunitário, não se deve supor simultaneamente que todas as infecções são uma consequência direta da infecção pelo FeLV.

Os gatos infectados pelo FeLV podem desenvolver atrofia do timo e depleção das zonas paracorticais dos linfonodos após a infecção. A linfopénia e neutropénia são bastante comuns, e para além disso, os neutrófilos de gatos com virémia possuem uma função quimiotática e fagocitária diminuída quando comparados com os neutrófilos de gatos normais. Em alguns gatos, a linfopénia pode ser caracterizada pela perda sobretudo de células T CD4⁺, o que resulta numa inversão da razão CD4/CD8 (como tipicamente observado na infecção por FIV) (Quackenbush, 1990; Hoffmann-Fezer, 1996. A IL-2 e IL-4 estão diminuídas em certos gatos, mas o FeLV não parece suprimir a produção de IL-1 a partir de macrófagos infectados. IFN- γ pode estar diminuído ou aumentado. Foi observado o aumento de TNF- α no soro de gatos infectados e em culturas de células infectadas. Cada citocina desempenha um papel fundamental na produção de uma resposta imune normal, sendo que o excesso de produção das mesmas, tais como TNF- α ,

também podem causar doença. A resposta humoral primária ou secundária está diminuída ou retardada em gatos infectados pelo FeLV (Hoffmann-Fezer, 1996).

Tabela 3: Sinais clínicos e principais mecanismos patológicos do FeLV(Hartmann K, 2012)

Síndrome Clínico	FeLV
Tumores	Maioritariamente Linfoma de Celulas-T
Supressão da Medula óssea	Comum; Anemia, Trombocitopénia, neutopénia, pancitopénia, infecção primaria das células precursoras e células do estroma da medula óssea;
Disfunções Neurológicas	Raro; influência direta do vírus, linfoma e efeito neurotóxico (da glicoproteína do envelope do FeLV);
Imunodeficiência	Comum; vários mecanismos, como por exemplo, a replicação do vírus em todas as células da medula óssea (incluindo neutrófilos), alteração no padrão de citocinas;
Doenças imunomediadas	Raro, por exemplo, anemia hemolítica imunomediada;
Estomatite	Comum; doença multifactorial;

2.6.3 Resposta Imunitária

A imunidade antiviral tende a reunir todos os meios para a defesa tecidular, celular e molecular, seja ela específica ou não, sendo utilizada pelo animal para se defender contra a infecção pelo FeLV. Esta resposta imune ocorre a dois níveis: na célula-alvo e contra os viriões libertados.

A imunidade humoral compreende os anticorpos e o sistema do complemento, sendo que os anticorpos são a resposta específica contra vírus e desempenham um papel importante na neutralização (anticorpos neutralizantes) e na destruição das células alteradas mediada por anticorpos. Os anticorpos contra o FeLV são esquematicamente divididos em duas categorias: os anticorpos sero-neutralizantes e outros AC. Ambos estão envolvidos na defesa do organismo contra o vírus, mas os seus efeitos nem sempre são benéficos. O princípio da ação dos anticorpos sero-neutralizantes consiste na sua capacidade de bloquear a ligação da gp70 ao recetor , e logo a absorção do FeLV e a entrada na célula hospedeira, (Hardy,1981). A resposta imunitária no que diz respeito aos AC sero-neutralizantes varia de acordo com o subgrupo de FeLV envolvido: os

anticorpos contra o subgrupo A possuem duas ações, protegem o animal contra o desenvolvimento da virémia e contra a reativação da infecção latente, que são principalmente devidos ao FeLV-A. Os anticorpos contra o subgrupo B normalmente aparecem mais tarde, após exposição ao vírus (Rojko, 1991). Existem também outros anticorpos antivirais que possuem um modo de ação diferente dos AC sero-neutralisantes, de facto, alguns felinos desenvolvem anticorpos anti-polimerase que inibem a replicação viral *in vivo*, diminuindo assim a progressão da infecção (Jacquemin, 1978). No entanto, nem todos os anticorpos são benéficos para o animal, os anticorpos dos respectivos antígenos, p27, gp70 e p15E, tendem a formar complexos imunes que são depositados nos glomérulos renais.

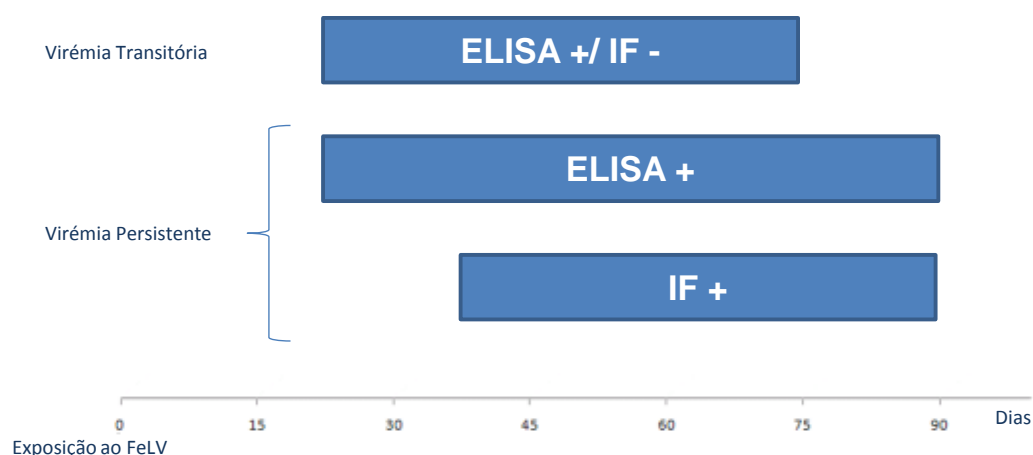
3. Diagnóstico

Os principais testes de diagnóstico são baseados na técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), que pesquisa a presença de antígenos no caso do FeLV (Dunham & Granham, 2008). Para o diagnóstico do FeLV a técnica de ELISA consiste na detecção da proteína da cápside (p27), já mencionada anteriormente, esta proteína da cápside é produzida em grandes quantidades pela maioria dos gatos infectados e encontra-se livre no plasma (Lutz et al., 2009). Esta técnica pode ser realizada em amostras de soro, plasma ou sangue total. Os resultados apresentam-se positivos antes da incorporação do material genético viral nas células da medula óssea ou seja na fase inicial de virémia (Cohn, 2007). Contudo os gatos com resultados positivos podem passar a apresentar resultados negativos, se a infecção for combatida antes do vírus atingir a medula óssea. Assim, os animais positivos ao teste ELISA devem ser re-testados no mínimo 90 dias após o primeiro teste (Hartmann, 2006; Cohn, 2007).

Para além do diagnóstico serológico, habitualmente efectuado por ELISA ou por imunocromatografia, pode ainda realizar-se imunoblotting, imunofluorescência indireta (IFI), quantificação de RT, isolamento viral, microscopia electrónica, PCR convencional e QRT-PCR (Ammerbach & Bienzle, 2011). O teste de imunofluorescência (IF) detecta a presença da p27 no citoplasma das células sanguíneas infectadas, nomeadamente leucócitos e plaquetas, utilizando-se para este efeito esfregaços de sangue total (Gomes-Keller et al., 2006; Cohn, 2007). O PCR é um método específico, sensível e particularmente útil no FeLV pois pode ser usado na detecção de provírus de FeLV presentes nas células, mesmo que o animal não se encontre em virémia, uma vez que nem sempre se detecta virémia, especialmente na infecção persistente (Hofmann-Lehmann et al., 2006). Através do PCR em Tempo Real é possível quantificar a carga proviral assim como a carga viral plasmática (virémia) (Tandon et al., 2005). Na fase de latência os

animais não possuem antígenos em circulação e não se encontram em virémia, contudo o vírus pode ser isolado a partir da medula óssea ou detectado enquanto provírus (Hofmann-Lehmann et al., 2006). A técnica “gold standard” para a detecção de FeLV, é talvez por este facto, o isolamento seguido de microscopia electrónica (Ammerbach & Bienzle, 2011), contudo, trata-se de uma técnica demorada e dispendiosa.

Figura 4: Resultados dos testes ELISA e IF em função do estado de virémia do animal



4. Prevenção

Os métodos considerados mais eficazes na prevenção e controlo das infecções pelo FeLV e FIV são a identificação e separação dos gatos infectados (Levy et al, 2008). Os animais infectados devem ser isolados dos outros animais para evitar o contacto com estes. Este procedimento é muito importante tanto para evitar a transmissão dos vírus a animais sãos como para evitar a transmissão de outras doenças ao animal infectado que possam deteriorar o seu estado clínico, visto serem animais imunodeprimidos (Cohn, 2007; Hartmann et al., 2007). É também imprescindível a realização de testes de diagnóstico para o despiste de FeLV e FIV em animais que vão ser introduzidos em ambientes com outros gatos (Crawford & Levy, 2007; Hartmann et al., 2007). Em relação à detecção do FIV é aconselhável que os gatos tenham um período de quarentena de 6 a 8 semanas, de modo a permitir que animais recentemente infectados desenvolvam níveis de anticorpos detectáveis (Hartmann et al., 2007).

Existem atualmente vacinas contra o FIV e o FeLV, no entanto não devemos esquecer que a vacinação não protege completamente contra a infecção, como mostra um estudo de 2006, isto é, nenhuma é 100% eficaz na proteção e prevenção da infecção (Kirpensteijn, 2006; Hofmann-Lehmann et al., 2006; Cohn, 2007) e, como há riscos potenciais na sua administração, é

importante avaliar caso a caso, se é vantajoso ou não proceder à vacinação (Hosie et al., 2009).

A vacina contra o FeLV, não é considerada essencial para os gatos com um baixo risco de exposição. Antes de iniciar a vacinação contra o vírus, deve-se testar os animais, pois em gatos infectados com FeLV, estes não devem ser vacinados, mas em gatos saudáveis sem infecção, a vacinação contra outras infecções virais é recomendada (Lutz H et al, 2013).

O protocolo de imunização habitual consiste na primo-vacinação entre as 8 e as 10 semanas, e uma segunda vacinação cerca de 3 a 4 semanas depois, com renovação anual.

5. Tratamento

O tratamento das retrovíroses tem como base uma terapia de suporte, um tratamento sintomático das infecções secundárias induzidas pela imunossupressão, e por fim uma terapêutica antiviral e /ou imunomoduladora específica. O acompanhamento clínico regular do animal é muito importante, particularmente durante a administração de fármacos capazes de induzir efeitos adversos (Doménech et al, 2011).

Animais com anemia não-regenerativa podem beneficiar de transfusões sanguíneas assim como de eritropoietina recombinante humana (Rh-EPO), (Hartmann et al., 2007). Em animais com leucopénia pode-se ter em conta o uso do factor de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF) (Hartmann, 2006). Nestes animais é muito comum a sintomatologia oral, sendo muitas vezes necessário um tratamento prolongado com utilização de doses altas de antibióticos e antifúngicos, se as lesões primárias forem causadas pela proliferação de bactérias ou fungos, respectivamente (Hartmann, 2004).

5.1 Imunomoduladores não específicos

No âmbito da terapia, em particular contra os retrovírus, os imunomoduladores têm um papel importante. Com efeito, eles atuam sobre o sistema imunitário para o tornar mais eficaz no controlo da carga viral, enquanto que os fármacos antivirais, agem diretamente sobre o vírus. Existem diversos tipos de imunomoduladores, mas alguns não estão licenciados a nível veterinário e ainda existem poucos estudos publicados para a maioria deles, em relação à espécie felina. Entre os imunomoduladores, alguns extratos naturais de plantas, também podem ser eficazes sobre a imunidade. No entanto, as evidências científicas ainda são raras até aos dias de hoje (Thacker E, 2010).

5.1.2 Glucocorticóides

Os glucocorticóides são usados para tratar uma ampla variedade de doenças inflamatórias,

incluindo as alergias, doenças autoimunes e por vezes doenças virais.

5.1.3 Extratos de bactérias e probióticos

Propionibacterium acnes provém de bactérias mortas. Este agente é um imunoestimulante não específico, em particular, através da ativação de macrófagos, células NK e aumentando a produção de interferão, interleucina-1 e TNF- α (Caney S, 2005; Plumb D, 2008). Este imunomodulador é utilizado no contexto de um protocolo de tratamento, em gatos com leucemia, ou possivelmente na rinotraqueíte felina.

A proteína *Staphylococcus A* (SPA) é um polipéptido estrutural da parede de uma bactéria, *Staphylococcus aureus* Cowan I (Lutz H et al, 2013). Esta possui propriedades imunomoduladoras com ação linfoproliferativa, ativando os linfócitos B e T e a produção de interferão. Tem sido relatado que também pode ter um efeito antiviral direto (Caney S, 2005).

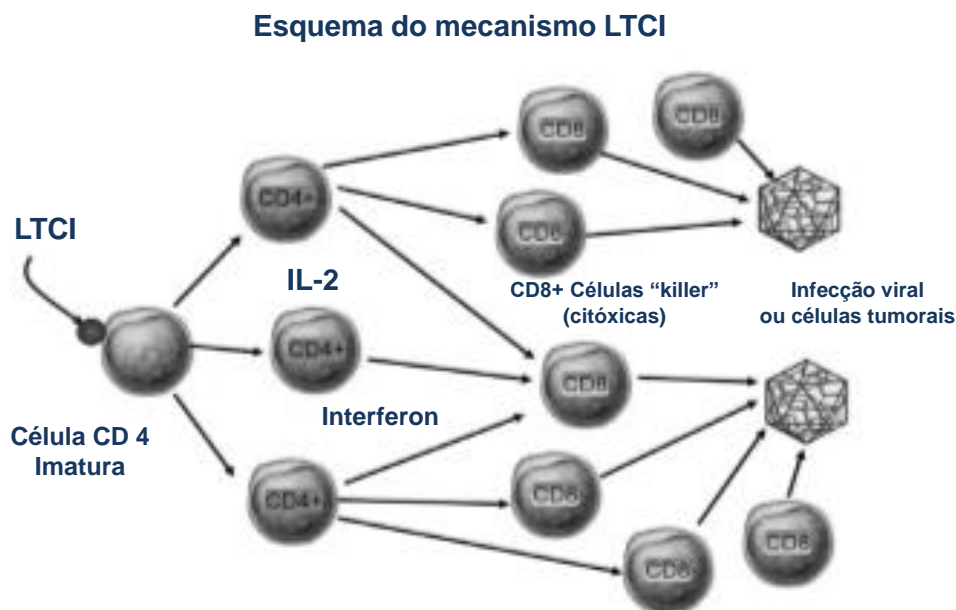
5.1.4 Proteínas virais imunoestimulantes

PIND-orf e PIND-avi são imunoestimulantes extraídos respectivamente do *Parapoxvirus ovis* e *Parapoxvirus avi*. Eles levam à estimulação das células NK, a um aumento da taxa de interferons e da taxa de G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos). Pind-orf é comercializado na Alemanha sob o nome Baypamum® (Bayer), e nos Estados Unidos, sob o nome Zylexis® (Pfizer) (Zylexis, 2014; Desenclos M.C, 2010).

5.1.5 Linfócitos T imunomoduladores (LTCI)

Os linfócitos T- imunomoduladores (LTCI), foram colocados no mercado veterinário nos Estados Unidos em dezembro de 2006 para o tratamento de gatos com infecções pelos retrovírus FeLV e FIV (Gingerich D., 2008). Este tratamento ainda não está disponível em França nem em Portugal. Os LTCI são proteínas produzidas por uma linha de células epiteliais do estroma do timo . A sua principal ação é dirigida às células T helper CD4 +, as quais, após a maturação, serão capazes de produzir citocinas como a IL-2 e interferão. Estas citocinas, por sua vez estimulam os linfócitos T citotóxicos CD8+ que induzem a apoptose das células infectadas pelo vírus e das células tumorais (Figura 5). Os LTCI potenciam tanto a imunidade mediada por células, como também a imunidade humoral, auxiliando também a combater os efeitos da infecção viral que normalmente impede a maturação das células T CD4+ e, portanto, a produção de IL-2 e estimulação de IFN, e CD8. Isto é importante para a medicina veterinária, porque, nos gatos, como em outras espécies, o timo é o principal órgão-alvo para a replicação viral (Gingerich D., 2008).

Figura 5: Sob ataque viral, as células CD4+ não amadurecem, não produzem IL-2 e interferão, e consequentemente, não conseguem estimular as células CD8+. Esta imunossupressão pode ser ultrapassada pelo tratamento com LTCI (Gingerich D., 2008).



5.2 Fitoterapia

Tem sido descrito que a fitoterapia, especificamente o *acemanan* pode ser bastante útil quando adicionado à terapêutica convencional.

O *acemannan* é um hidrato de carbono complexo solúvel em água, extraído da planta Aloé Vera. Esta molécula é conhecida por estimular *in vitro* e *in vivo* a resposta imunitária, o que resulta numa atividade antiviral e anti-tumoral (Caney S, 2005; Lee J. et al, 2001). É um imunoestimulante não específico, o qual já foi utilizado no tratamento de gatos com FIV, FeLV, ou PIF. No entanto, o seu uso é controverso, devido à falta de estudos existentes sobre o assunto, e sobre a sua eficácia (Plumb D., 2008).

A atividade imunoestimulante do *acemannan* é devida ao facto desta molécula induzir um aumento de TNF- α e IL-1, mas também de PGE2 (prostaglandina E2) (Caney S, 2005).

Um estudo realizado *in vitro*, em 2001, demonstrou que o *acemannan* possui um papel ao nível da maturação funcional das células dendríticas imaturas, sendo esta maturação dose-dependente. Está também descrito que o *acemannan* possui uma atividade imunomoduladora através da sua ligação a receptores de manose dos macrófagos. Estes são assim ativados produzindo citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , e aumentando a fagocitose (Lee J. et al, 2001; Yates KM et al, 1992). Para além disso, o *acemannan* possui uma atividade antiviral através da

alteração da glicosilação das células infectadas pelo vírus, inibindo assim a replicação viral (Yates KM et al, 1992).

Em França existe um produto veterinário disponível com o nome de Endostim®, produzido pelo Laboratório de Veterinária Demeter (Figura 6). A terapêutica consiste na administração via oral, de uma dose de 1 a 3 ml uma vez ao dia durante três meses. Estas doses podem ser duplicadas, se necessário, (De Clercq, 2002) . Nos EUA, existe sob o nome de Carrisyn ®, produzido pelo laboratório Carrington (de Mari et al., 2004).

Figura 6: Acemannan, extraído da planta Aloé Vera: Endostim®



5.3 Terapêutica Antiviral

A terapêutica antiviral tem como função o combate direto da infecção viral mas a sua administração como tratamento de retroviroses felinas é relativamente incomum (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Dunham & Graham, 2008). A maioria destes fármacos estão licenciados para medicina humana e, deste modo, não estão aferidas doses nem estabelecidos protocolos para o seu uso em medicina veterinária, para além da toxicidade e efeitos secundários indesejáveis que podem originar nos animais (Caney S, 2005; Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006). Dentro destes fármacos estão incluídos o AZT (Zidovudina- Retrovir®), Ribavirin (Rebetol®), Zalcitabine (HIVID®) e Foscarnet (Foscavir®), podendo ser utilizados isoladamente ou em associação (Doménech et al., 2011).

5.3.1 AZT - Zidovudina

O AZT (zidovudina - Retrovir®, da Glaxo-Wellcome) é um análogo de nucleósidos (timidina) em que o mecanismo de ação consiste no bloqueio da transcriptase reversa dos retrovírus, evitando a transcrição do RNA viral em DNA pró-viral por inclusão de uma timidina alterada na sequência nucleosídica nascente (Tavares et al 1987; Caney S, 2005). Isto cria um efeito virostático, a replicação viral e assim a infecção celular são inibidas (Caney S, 2005; Plumb D.C, 2008). A molécula tem uma melhor afinidade pelas enzimas virais do que pelas células hospedeiras (Davis J.L, 2009). Tem sido demonstrado que este fármaco reduz a carga viral

plasmática e melhorara o estado imunológico e clínico dos gatos com retrovíroses felinas (Hartmann et al., 1999). Em medicina veterinária, a zidovudina pode ser considerado para o tratamento de FIV ou FeLV, para reduzir a carga viral e os sinais clínicos. No entanto, esta molécula não consegue eliminar a doença, tratando-se de um tratamento apenas paliativo (Plumb D.C, 2008). Várias doses são possíveis durante o curso da infecção pelo FeLV e / ou FIV:

- 5mg/kg por via oral ou por via subcutânea a cada 12 horas (Plumb D.C, 2008);
- 5mg/kg PO 3 vezes por dia, durante 5 semanas, e depois um intervalo de descanso de 5 semanas (Plumb D.C, 2008);
- Em caso de encefalopatia devido ao FIV, é recomendado 20mg/kg PO a cada 12 horas (Plumb D.C, 2008);

5.3.2 Ribavirin

O Ribavirin, comercializado sob o nome de Virazole ® em França é um análogo de nucleosídeo, mas ao contrário de outros fármacos antivirais, ele inibe a síntese de proteínas virais (Caney S, 2005). Este fármaco antiviral é amplamente utilizado na medicina humana mas deve ser evitado em medicina felina devido aos efeitos adversos ao qual está associado (anemia, supressão medular, toxicidade gastrointestinal e afecções nervosas) (Davis J.L, 2009). Os estudos *in vitro* mostraram uma atividade antiviral de amplo espectro contra muitos vírus de RNA e DNA, tais como os vírus respiratórios de RNA influenza A e B, o herpes vírus, mixovírus, paramixovírus, arenavírus, bunyavírus, retrovírus e adenovírus (Davis J.L, 2009; Hartmann K, 2005).

5.3.3 Zalcitabine

Zalcitabine é um inibidor da transcriptase reversa, inibindo a replicação do retrovírus FeLV. A sua eficácia antiviral contra o FeLV foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*, sendo dependente da célula-alvo (Polas P, 1990).

5.3.4 Foscarnet

Foscarnet ou PFA, é um análogo do pirofosfato que possui a capacidade de inibir várias enzimas virais: DNA polimerase, RNA polimerase e a transcriptase reversa. O mecanismo antiviral consiste na inibição não-competitiva das enzimas virais (Davis J., 2009).

Apesar da variedade de medicamentos antivirais na medicina humana, a disponibilidade e aplicação destes medicamentos rotineiramente em medicina veterinária, e mais especificamente, sobre os retrovírus felinos, ainda são limitados (Bisset L., 2002). Além disso, estas moléculas possuem um efeito tóxico em gatos e as suas administrações podem incentivar o desenvolvimento de resistências em relação aos retrovírus (Bertalogni S, 2008). A inexistência de um tratamento

eficaz e seguro contra o FIV e o FeLV tornam importantes os tratamentos alternativos como o uso de imunomoduladores mais específicos, particularmente os interferões tipo I que possuem efeitos anti-virais (Collado et al., 2006; Doménech et al., 2011).

5.4 Interferão

O interferão é uma das citocinas mais estudadas, sendo proteínas reguladoras importantes no sistema imunitário dos mamíferos. É produzido em células como fibroblastos, linfócitos e células hematopoiéticas de mamíferos quando estas são alvo de uma infecção viral, sendo veiculado pela circulação sanguínea e atuando ao nível das células não infectadas, induzindo-as a um estado antiviral (Sen, 2001).

O IFN é um mediador intercelular capaz de agir a curta e longa distância e capaz de induzir rapidamente nas células uma ação antiviral. A sua síntese é naturalmente aumentada em infecções virais e bacterianas. A ligação do IFN aos seus receptores à superfície das células, pode resultar em diferentes efeitos possíveis:

- Antiviral, através da inibição da replicação viral, destruição do RNA mensageiro, e inativação das proteínas de transdução (Paltrinieri, 2007);
- Anti-inflamatório, através da diminuição dos marcadores sanguíneos da inflamação (α -globulinas, α 1-glicoproteínas) (Doménech, 2011; Paltrinieri, 2007);
- Anti-proliferativo: inibição da multiplicação celular das células tumorais (Doménech, 2011; Paltrinieri, 2007);
- Imunomodulador : o interferão tem um papel na estimulação da resposta imunitária levando ao aumento da citotoxicidade das células natural killer (NK), aumentando a produção de MHC I (Complexo de Histocompatibilidade de Classe I) e, em particular, a apresentação de antígenos às células T, e finalmente, através do aumento da atividade enzimática dos neutrófilos (Paltrinieri, 2007; Petit, 2011; Siméon, 2009).

Quando os vírus infectam as células, ocorre a produção por estas de produtos virais geneticamente codificados, e estes por sua vez induzem a síntese e excreção de IFNs. Os IFNs vão-se ligar aos domínios extracelulares dos receptores espécie-específicos existentes à superfície das células, conduzindo à ativação dos genes IFN-stimulated (ISG) cujos produtos inibem, em várias fases, a replicação viral. No entanto, algumas destas proteínas virais são latentes até à sua ativação por produtos virais. Alguns ISGs podem ser ativados diretamente, por exemplo, pelo RNA viral, assim, as proteínas resultantes destes genes são formadas nas células infectadas por vírus sem que haja intervenção dos IFNs (Sen, 2001).

São conhecidos dois tipos de interferência: o tipo I, que inclui entre outros o IFN- α , IFN- β e IFN- ω , e o tipo II que inclui o IFN- γ (Pestka et al., 2004). Os IFNs do tipo I exibem uma atividade antiviral e anti-proliferativa tendo também influencia na resposta imune adaptativa (Gerlach et al., 2006), enquanto que os IFN do tipo II têm uma função principalmente imunomoduladora (Collado et al., 2007). Estes interferências são produzidos por diferentes células, os leucócitos produzem IFN- α , os fibroblastos IFN- β , os trofoblastos IFN- ω e os linfócitos T ativados (linfócitos T helper CD4+ e linfócitos T citotóxicos CD8+) e células NK (Natural Killer) IFN- γ (Collado et al., 2007; Doménech et al., 2007). O primeiro mecanismo afectado é a síntese de proteínas virais (Samuel, 2001). Após a sua administração, o IFN liga-se a receptores específicos de uma grande variedade de células, alterando o mecanismo de replicação viral, por destruição do RNAm e inativação das proteínas de transcrição (Samuel, 2001). Assim sendo, os IFNs são utilizados na clínica de animais de companhia, principalmente o interferão alfa recombinante humano (rHuIFN- α) e o interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω) (Collado et al., 2006). Ambos os interferências mostraram eficácia no tratamento de gatos com FIV e com FeLV e têm sido propostos para o seu tratamento tanto de uma forma isolada (Riondato et al., 2003; de Mari et al., 2004) como em associação com AZT (Hoover et al., 1990). No entanto, não está completamente esclarecido se apenas melhoram a resposta imune enquanto imunomodulador ou se tem efeito direto na expressão do vírus (Collado et al., 2007). De uma forma geral a maioria dos estudos relacionados com a utilização dos IFNs têm mostrado que a síntese das proteínas retrovirais não é afectada, o que sugere que estes atuam nos últimos estágios do ciclo viral, impedindo a montagem correta do vírus ou a libertação de partículas virais (Gómez-Lucía et al., 2009).

5.4.1 Interferência alfa recombinante Humano (rHeIFN- α)

O interferência recombinante alfa Humano foi o primeiro a estar disponível no mercado (rHuIFN- α , Roféron®, Roche), sendo produzido através de um gene clonado e expresso em *Escherichia coli*. O seu verdadeiro efeito não é viricida, mas bloqueia a síntese de proteínas virais através da ligação a receptores específicos que ativam a síntese de enzimas, impedindo assim a produção de novas partículas virais (Hartmann, 2005).

A absorção deste fármaco, após administração por via oral, é baixa devido à degradação enzimática que sofre no intestino, sendo que os seus níveis na circulação sistémica não são mensuráveis. O seu metabolismo é principalmente realizado a nível renal (Plumb, 2008). Os interferências são específicos de cada espécie, e nesse sentido, a administração de IFN humano

induz uma produção de anticorpos neutralizantes dirigidos contra o IFN, em 3-7 semanas após o início do tratamento, podendo inibir desta forma o efeito desejado do tratamento (Doménech, 2011; Hartmann, 2005; Paltrinieri, 2007). A atividade biológica é específica de cada espécie, portanto, o tratamento com interferão humano será menos eficaz em gatos do que em seres humanos (Doménech, 2011).

Além disso, o IFN- α administrado oralmente, pode ser inativado devido à acidez gástrica e, como outras proteínas, destruído pela tripsina e outras enzimas proteolíticas do duodeno. Assim sendo este IFN é mal absorvido, e pode não ser detectado no sangue (Hartmann, 2005).

5.4.2 Interferão ómega recombinante felino ω (rFeIFN- ω)

O rFeIFN- ω possui vantagens em relação ao interferão alfa recombinante humano (rHeIFN- α), nomeadamente não ser reconhecido como um antígeno exógeno pelo sistema imunitário. Portanto, não se verificam os efeitos de indução de anticorpos neutralizantes contra o interferão (Caney S., 2005; Gil S. et al, 2013). O rFeIFN- ω é um interferão de tipo I, como o rHeIFN- α , sendo este produzido por engenharia genética (Paltrinieri S, 2007; Petit S, 2012). O rFeIFN- ω apresenta uma homologia de 65% com o rHeIFN- α . As suas propriedades antivirais, farmacocinéticas, e farmacológicas são semelhantes ao IFN- ω produzido naturalmente pelas células do animal (Paltrinieri S., 2007). Quando administrado por via subcutânea, rapidamente se liga a receptores específicos de várias células (Petit S, 2012).

O rFeIFN- ω está indicado para o tratamento dos retrovírus felinos: FeLV e FIV. Tem sido descrito que também pode ser eficaz em infecções agudas por calicivírus, coronavírus e herpes vírus (quando a infecção é localizada a nível ocular e utilizando tratamentos tópicos), mas os estudos são limitados a estas indicações (Plumb D.C, 2008). O tratamento com IFN pode também ser utilizado contra o parvovírus (Paltrinieri S., 2007) e no caso de gatos com PIF (Hartmann K, 2005).

Dois estudos em 2011 e 2013 relataram uma melhoria da condição geral e dos parâmetros hematológicos em gatos FeLV/FIV-positivos e (Gil S. et al, 2013; Doménech A, 2011) uma melhoria dos sinais clínicos nas infecções por calicivírus e herpesvírus foram também mencionadas num estudo de 2013 (Gil S. et al, 2013). Depreende-se deste estudo que a melhoria clínica é evidente para a maioria dos casos, contudo os gatos FIV + possuem melhores resultados do que os gatos FeLV +. Esta é a primeira vez que o rFeIFN- ω comprova a sua eficácia em gatos imunodeprimidos devido a retrovirose. Este estudo simula a realidade dos abrigos ou gatis, onde a prevalência destas doenças é elevada. Os resultados mostraram que o rFeIFN- ω tem um efeito

benéfico sobre a excreção viral e os sintomas clínicos de gatos naturalmente infectados com retrovírus (Gil S. et al, 2013).

Como efeitos indesejados estão descritos uma ligeira diminuição dos eritrócitos, plaquetas e glóbulos brancos e o aumento da ALT (alanina aminotransferase) também pode ocorrer, no entanto há um retorno aos padrões normais o mais tardar uma semana após a última injeção do tratamento (Gil S. et al, 2013; Plumb D.C, 2008). Como efeitos adversos podem ocorrer hipertermia nas primeiras horas após a injeção, vômitos ou diarreia e fadiga transitória (Petit S, 2012; Plumb D.C, 2008). Atualmente, não há informação disponível sobre os efeitos colaterais a longo prazo. Por outro lado, nenhum teste foi conduzido em gatas gestantes ou lactantes (Petit S, 2012). Quando um gato tem uma doença crônica associada, como doença renal, hepática ou insuficiência cardíaca, os parâmetros bioquímicos e hematológicos para estas doenças devem ser verificados antes da introdução da terapia com interferão (Petit S, 2012).

Não têm sido relatados até o momento interações medicamentosas, no entanto, deverá ser usado com precaução quando estão em curso tratamentos com fármacos hepatotóxicos ou supressores medulares (Plumb D.C, 2008).

O tratamento recomendado para o tratamento de FIV e FeLV é o seguinte: 1.000.000 U / kg SC uma vez por dia, durante 5 dias, para realizar três vezes a partir de: D0 a D4, D14 a D18, e D60 a D64 (Plumb D.C, 2008). Podem receber este tratamento gatos com 9 semanas de idade ou mais, que estejam num estágio não terminal de infecção (Petit S, 2012; Plumb D.C, 2008).

A introdução da terapêutica antiviral com interferão permite, em alguns casos, uma melhoria dos sinais clínicos e um aumento da esperança de vida, de algumas doenças virais, em particular o FeLV, FIV, e o herpes vírus (Doménech A, 2011). Mais de 50 anos após a descoberta da existência dos interferões, o seu mecanismo de ação, a sua interação com agentes virais no contexto de uma resposta imune ainda está mal compreendida, dificultando assim a melhoria do tratamento (Levy D.E, 2011) e a optimização de diferentes protocolos.

5.5 Tratamento utilizado durante o estágio no “CHUVA – Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d’Alfort”

5.5.1 Gestão dos gatos assintomáticos

Para gestão dos gatos assintomáticos deve-se recorrer à utilização profilática de vacinas, antiparasitários, esterilização dos animais, monitorizar a higiene bucal, efetuar um controlo regular do estado clínico geral do animal, parâmetros bioquímicos e hematológicos, sendo recomendado realizar um hemograma 2 vezes por ano (Levy, 2009).

5.5.2 Terapêutica sintomática

Antes de iniciar o tratamento, deve ser realizado um exame clínico completo, seguido de exames complementares, uma vez que é essencial, na medida do possível, identificar as causas da doença para instauração da terapêutica mais adequada (Little, 2012).

Quando os gatos apresentam sinais clínicos, os glucocorticóides e outros agentes imunossupressores devem ser evitados, exceto em casos particulares, como na terapia de tumores malignos associados com o FeLV ou na gengivite (ABCD, 2012).

Antibióticos de largo espectro podem ser considerados e administrados para o tratamento de infecções bacterianas secundárias. A resposta ao tratamento dos gatos infectados com FeLV é mais lenta, e o tratamento deve ser realizado com doses mais elevadas e com uma maior duração. Para o tratamento de uveítes usa-se a terapêutica clássica associada com um tratamento específico para o vírus, como administração de rFeIFN- ω , de rHuIFN- α , ou de l'AZT (Shukla, 2012).

A inversão do rácio CD4+/CD8+, isto é, quando o rácio normal de 2 : 1 passa a <1 : 1, o gato encontra-se num estado de imunossupressão o que facilmente pode levar ao aparecimento de doenças oportunistas (Little, 2012 ; Barr, 2006).

Quando a doença está declarada, um tratamento precoce, mais longo e com doses mais elevadas é necessário (ABCD, 2012; Little, 2012), contudo a hospitalização não é obrigatoriamente necessária, exceto em caso de complicações como gatos anoréxicos e fluidoterapia indispensável (Barr, 2006).

5.5.3 Terapêutica antiviral

A eficácia dos fármacos antivirais é limitada, uma vez que estes provocam vários efeitos secundários graves. As moléculas utilizadas foram a zidovudina, adefovir, abacavir e lamivudina. A sua utilização deve ser realizada em gatos que não estejam na fase terminal da doença.

5.5.3.1 Zidovudina

Várias doses são possíveis utilizando a terapêutica com zidovudina durante o curso da infecção pelo FeLV e / ou FIV:

- 5mg/kg por via oral ou por via subcutânea a cada 12 horas (Plumb D.C, 2008);
- 5mg/kg PO 3 vezes por dia, durante 5 semanas, e depois um intervalo de descanso de 5 semanas (Plumb D.C, 2008);
- Em caso de encefalopatia devido ao FIV, é recomendado 20mg/kg PO a cada 12 horas (Plumb D.C, 2008);

5.5.3.2 Adéfovir ou PMEA

O PMEA, e moléculas semelhantes possuem atividade contra os retrovírus, mas também contra o herpes vírus e calicivírus. Este agente antiviral também tem um efeito imunomodulador, resultando num aumento de interferão, e na atividade das células natural killer (células NK), possuindo também um efeito anti-proliferativo (Hartmann K, 2012). O PMEA provoca uma inibição das enzimas transcriptase reversa e certas DNA polimerases dos retrovírus, (Hartmann K, 2012). Tem sido demonstrado que o PMEA inibe a replicação in vitro do FeLV. Efeitos semelhantes têm sido demonstrados em FIV (Davis J, 2009). Esta molécula não previne a infecção, mas retarda a progressão da viremia e aumenta a proporção de células T CD4 + / CD8 + (Roberts K, 2008).

5.5.3.3 Abacavir

Abacavir, também conhecido como ABC ou 1592U89, é um análogo de nucleosídeo capaz de inibir a replicação do FIV in vitro (Bisset L, 2002). É um inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa. Esta molécula pode ser útil como tratamento complementar de AZT e lamivudina, tendo de facto, um efeito sinérgico com o AZT (Bisset L, 2002).

Um estudo realizado em 2002 mostrou que uso simultâneo dos análogos nucleosídeos abacavir, zidovudina e lamivudina, podem inibir a replicação do FIV in vitro de forma sinérgica (Bisset L, 2002). No entanto, os autores relatam uma toxicidade mais elevada desta molécula em relação à AZT ou lamivudina.

A partir deste estudo, pode ser interessante utilizar o abacavir, como parte de uma tri-terapia, tendo contudo, uma especial atenção aos efeitos adversos.

5.5.3.4 Lamivudina

Lamivudina, é também conhecido como 3TC, é um composto idêntico à zidovudina (Bertalogni S, 2010). Nos gatos, esta molécula tem sido amplamente estudada, porque tem um perfil de inocuidade superior à AZT [17]. A lamivudina é mais eficaz in vitro contra o FIV, quando em comparação com outros anti-retrovirais, incluindo o AZT. Na espécie felina a farmacocinética é semelhante ao AZT (Davis J, 2009).

5.5.4 Tratamento imunomodulador

É possível utilizar como terapia imunomoduladora, tanto para o FIV como para o FeLV, o interferão recombinante felino ómega e o interferão alpha recombinante humano (rHuIFN- α) usando as mesmas posologias. Para o tratamento de gatos FeLV+ com o rHuIFN- α , existem 2 terapêuticas possíveis:

- Doses baixas : 30 UI PO, por gato, por dia, 7 dias de tratamento a cada duas semanas;
- Doses altas : 10 000- 1 000 000 UI por Kg, via SC (subcutânea), SID (uma vez por dia) (Plumb, 2008).

No que diz respeito ao tratamento com interferon ômega recombinante felino, Virbagen®, a posologia indicada é 1 milhão UI/Kg/ dia SC durante 5 dias consecutivos, em 3 vezes : uma primeira vez do dia 0 ao dia 4 (D0 ao D4), depois do D14 ao D18, e por fim do D60 ao D64 (Little, 2012). Está comprovado que melhora o estado geral e os sinais clínicos dos gatos prolongando o seu tempo de vida .

5.5.5 Tratamento da anemia

O FeLV provoca muitas vezes anemia, normalmente não regenerativa. É muito importante combater a hipóxia, sendo que a primeira fase e a maior parte do tratamento consiste numa transfusão sanguínea. Posteriormente, é necessário estimular a eritropoiése, podendo utilizar para esse efeito diretamente a eritropoietina (EPO), ou androgénios que vão estimular a sua síntese, permitindo assim uma melhor oxigenação. Os androgénios de síntese utilizáveis encontram-se descritos na tabela seguinte (Little, 2012).

Tabela 4: Androgénios utilizados no tratamento da Anemia

Substância Activa	Dose	Duração	Via Administração	Efeitos Secundários
Nandrolona	1-5mg/Kg/semana	Re-administrar, se necessário, 3 semanas depois(nunca antes das 2 semanas);	IM	Poucos efeitos secundários; Hepatomegália e masculinização, por vezes;
Stanozolol	0,25 – 3mg/Kg/dia	6 semanas a 3 meses	PO	
	2 – 10mg/Kg/semana	6 semanas a 3 meses	IM	
Danazol	5mg/Kg/BID	6 semanas a 3 meses	PO	

Materiais e Métodos

1. Desenho Experimental

O estudo para a avaliação da expressão imunitária em gatos infectados com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) tratados com interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω), foi realizado com 6 gatos FeLV-positivos, tratados com rFeIFN- ω segundo o protocolo licenciado (3 ciclos de 5 injeções subcutâneas 1MU/kg aos dias 0, 14, 60). Antes do início do tratamento (D0) e no seu término (D65), os animais foram sujeitos a colheitas de sangue para avaliação da expressão relativa de citocinas e da proteína Mx por PCR em tempo real.

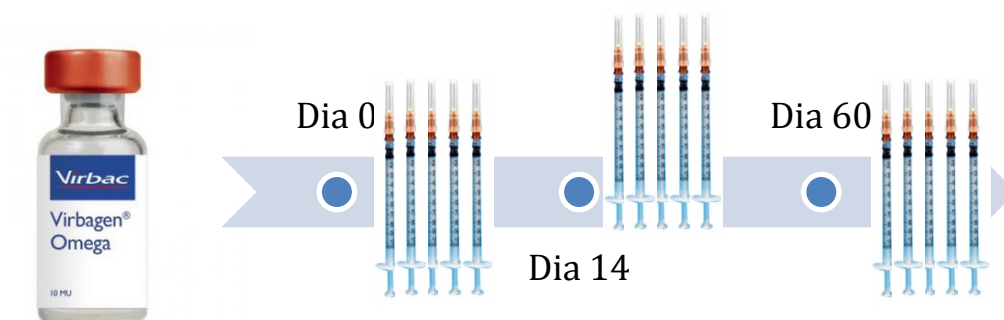
2. Amostra Populacional

Este estudo foi realizado numa população de 6 gatos adultos, sendo 4 machos e 2 fêmeas, raça Europeu Comum, com idade entre os 3 e 8 anos, alojados na União Zoófila de Lisboa (U.Z.L.). Sendo que estes animais estudados encontravam-se naturalmente infectados por FeLV.

3. Plano terapêutico

A terapêutica administrada consistiu no interferão ómega recombinante de origem felina (rFeIFN- ω - Virbagen® Omega, Virbac). Sendo o produto administrado, por via subcutânea, 1 vez por dia, durante 5 dias consecutivos de acordo com o protocolo licenciado, tendo sido realizados três ciclos de tratamentos iniciados ao dia 0, 14 e 60 (Figura 7). A dose foi de 1 MU/Kg de peso vivo.

Figura 7: rFeIFN- ω - Virbagen® Omega/ Ciclos Terapêuticos



4. Plano de Colheita Amostras

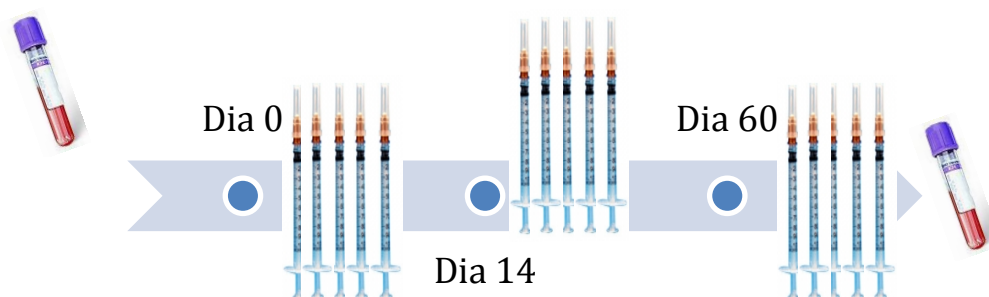
Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comité de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa (CEBEA - FMV-UL).

Do mesmo modo que para os estudos publicados anteriormente (Gil, Leal, Duarte et al, 2013;.. RO Leal, Gil, Sepulveda, et al, 2013;.. RO Leal, et al, 2014), foi aplicada uma política de

avaliação a cada grupo, o que significa que para cada parâmetro, os valores no D0 foram definidos como base e foram tidos como controlo individual para cada gato.

Realizaram-se colheitas de sangue aos 9 animais da amostra populacional aos dias zero, primeiro dia da aplicação do rFeIFN- ω e dia sessenta e cinco (dia 65) após início do tratamento (Figura 8).

Figura 8: Dias de colheita das amostras



5. Processamento das Amostras

O processamento das amostras realizou-se no Laboratório de Virologia e Imunologia da FMV/UL. As amostras de sangue foram colhidas para tubos contendo um tampão para protecção de RNA (RNAprotect Animal Blood Tubes, Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi extraído usando um Kit específico (RNeasy protect animal blood kit, Qiagen). De seguida, foi sintetizado o cDNA (Transcriptor high fidelity, Roche), sendo este utilizado posteriormente como “template” para o PCR em tempo real “Real-Time quantitative polymerase chain reaction” (qPCR), com o objectivo de quantificar a expressão das seguintes citocinas: IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL12p40, IFN e TNF α e da proteína Mx.

6. Primers e Ciclos de Amplificação de PCR utilizados no FeLV

Os primers utilizados para cada um dos genes estão publicados na literatura, sendo que os autores e respectivas sequências são apresentados na tabela 5 e 6. Os primers foram obtidos a partir de um fabricante comercial (STAB VIDA, Portugal).

Tabela 5: Primers utilizados para avaliação da expressão de citocinas através do Real-Time qPCR em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω

Gene	Oligo	Sequência (5'-3')	Referencia
β - Actina	For	GACTACCTCATGAAGATCCTCACG	(Scott, et al., 2011)
	Rev	CCTTGATGTCACGCACAATTTC	
IL-1	For	ATTGTGGCTATGGAGAACTGAAG	(Scott, et al., 2011)
	Rev	TCTTCTTCAAAGATGCAGCAAAAG	
IL-4	For	CCCCTAAGAACACAAGTGACAAG	(Taglinger, Van Nguyen, Helps, Day, & Foster, 2008)
	Rev	CCTTTGAGGAATTTGGTGGAG	
IL-6	For	GTGTGACAACTATAACAAATGTGAGG	(Scott, et al., 2011)
	Rev	GTCTCCTGATTGAACCCAGATTG	
IL-10	For	ACTTTCTTTCAAACCAAGGACGAG	(Scott, et al., 2011)
	Rev	GGCATCACCTCCTCCAAATAAAAC	
IL12p40	For	TGGCCTTCTGAAGCGTGTTG	(Scott, et al., 2011)
	Rev	GAAGTACACAGTGGAGTGTGAGG	
IFN- γ	For	TGCAAGTAATCCAGATGTAGCAG	(Taglinger, et al., 2008)
	Rev	GTTTTATCACTCTCCTCTTTCCAG	
TNF- α	For	CACATGGCCTGCAACTAATC	(Taglinger, et al., 2008)
	Rev	AGCTTCGGGGTTTGCTACTAC	

Tabela 6: Primers e sonda utilizados para avaliação da expressão da Proteína MX através do Real-Time qPCR em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω

Gene	Oligo	Sequência (5'-3')	Referencia
β - Actina	For	GACTACCTCATGAAGATCCTCACG	(Scott, et al., 2011)
	Rev	CCTTGATGTCACGCACAATTTC	
TaqMan Probe		JOE- CCTTGATGTCACGCACAATTTC- TAMRA	(Scott, et al., 2011)
MX	For	ACCAGAGCTCGGGCAAGAG	(Scott, et al., 2011)
	Rev	TTCAGCACCAGAGGACACCTT	
TaqMan Probe		FAM-CCTTCCCAGAGGCAGCGGTATTGTC - TAMRA	(Scott, et al., 2011)

O PCR em tempo real foi realizado no equipamento StepOne Plus real-time (Applied Biosystems). A quantificação da expressão de citocinas por PCR em tempo real em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω , foi realizada utilizando para cada reação 2 μ l de cada primer com uma concentração final de 100nM, 2 μ l de cDNA, 4 μ l de água esterilizada e 10 μ l de mistura para PCR contendo SYBr Green (Applied Biosystems) num volume total de 20 μ l por reação. Para avaliação da expressão da proteína MX foram usados para cada reação 2 μ l de cDNA, 900nM de cada primer e 250nM de sonda (TaqMan Probe), num volume total de 20 μ l por reação usando TaqMan® Gene Expression 2x Master Mix (Applied Biosystems).

Os ciclos de amplificação de PCR consistem numa fase inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida de 50 ciclos de amplificação (15 segundos a 95°C e annealing aos 60°C durante 1 minuto).

7. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados, nomeadamente para a quantificação da expressão relativa de cada citocina e da proteína MX foi utilizado o software Miner (<http://www.miner.ewindup.info>). A beta-actina foi usada como o gene de referência (tabela 5 e 6). Para cada parâmetro medido, foram comparados dois grupos usando o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon para amostras independentes. A comparação entre o início e o fim da terapia em cada grupo foi realizada pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon. O nível de significância foi estabelecido em 5%. A análise estatística descritiva foi também realizada sempre que necessária. A fim de avaliar possíveis correlações entre os parâmetros medidos, a correlação de Spearman também foi realizada sempre que necessário. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R.

8. Resultados

8.1 Caracterização da amostra populacional

O estudo foi realizado numa população de 6 gatos adultos, sendo 4 machos e 2 fêmeas, raça Europeu Comum, com idade entre os 3 e 8 anos, naturalmente infectados por FeLV, alojados na União Zoófila de Lisboa (U.Z.L.).

8.2 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos podem ser muito variáveis, dependendo da idade do animal aquando da exposição ao vírus, da eficácia da resposta do sistema imunitário, da exposição e possível co-infecção por outros agentes patogénicos, da patogenecidade do vírus, e do subtipo implicado na infecção, principalmente no que diz respeito ao FeLV (Hartmann, 2011). Um estudo realizado em 2011 evidencia uma melhoria da condição clínica dos animais infectados por retrovírus, principalmente nos animais com uma sintomatologia mais acentuada, quando tratados com rFeIFN- ω , enquanto que a condição clínica dos animais sem sintomatologia ou com sintomatologia ligeira não se verificaram alterações ao longo do tratamento (Doménech et al., 2011).

Com vista a padronizar o exame clínico foi utilizada uma escala de acordo com uma publicação anterior do grupo (Gil et al, 2013) (Tabela 7).

Tabela 7: Pontuação clínica – escala usada para classificação clínica em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω

Parâmetros clínicos	Pontuação
Úlceras orais/ Gengivite	0 – Sem evidência de lesão oral 1 – Ligeiras a moderadas lesões orais 2 – Lesões orais severas
Estomatite	0 – Sem evidência de lesão 1 – Estomatite Ligeira 2 – Estomatite Severa
Afecções oftálmicas	0 – Sem evidência de lesões 1 – Ligeira hiperemia conjuntival(sobretudo unilateral), ligeira queratite 2 – Severa hiperemia conjuntival(bilateral), queratite marcada
Linfadenopatia	0 – Sem evidência de linfadenopatia 1 – Ligeira linfadenopatia localizada 2 – Linfadenopatia generalizada
Secreções oculares	0 – Sem evidência de secreções oculares 1 – Secreção ocular serosa 2 – Secreção ocular muco-purulenta
Secreções nasais	0 – Sem evidência de secreções nasais 1 – Secreção nasal serosa 2 – Secreção nasal muco-purulenta
Mucosas Pálidas	0 – Sem evidência de mucosas pálidas 1 – Mucosas ligeiramente pálidas 2 – Mucosas com palidez severa
Pelagem seca/ Seborreia	0 – Pelagem normal 1 – Pelagem seca e /ou seborreia
Condição corporal	0 – Normal ou excesso peso: condição corporal(CC) de 4/6 a 6/6 1 – Ligeira diminuição da CC: 3/6

	2 – Peso baixo, CC 1/6 a 2/6
Diarreia	0 – Sem evidência de diarreia 1 – Evidência clínica de diarreia
Doenças Secundárias	0 – Sem evidência de doenças secundárias +1 – Evidência clínica de doenças secundárias +2 – Prostração severa e fraqueza generalizada

Os resultados neste estudo mostram que a maioria dos gatos apresentou uma evolução clínica positiva, levando desta forma à conclusão que o tratamento com rFeIFN- ω induziu efeitos benéficos no que respeita à sintomatologia clínica dos animais FeLV+ (Tabela 8). De entre os sinais clínicos, as lesões associadas à cavidade oral, tais como úlceras e gengivites que são considerados como os principais sinais clínicos associados a estas retrovíroses, (Collado et al., 2007; Hartmann, 2011), são as que parecem responder melhor ao tratamento, em gatos FeLV+ (Tabela 8). Estas observações vão ao encontro dos resultados obtidos em estudos anteriores que concluem que animais FeLV+, apresentam uma diminuição da taxa de mortalidade e notórias melhorias a nível clínico quando sujeitos à terapêutica com rFeIFN- ω (de Mari et al., 2004).

Tabela 8: Pontuação clínica para cada parâmetro avaliado em gatos naturalmente infectados com FeLV tratados com rFeIFN- ω

Parâmetros clínicos	Gato 1 D0/D65	Gato 2 D0/D65	Gato 3 D0/D65	Gato 4 D0/D65	Gato 5 D0/D65	Gato 6 D0/D65
Úlceras orais/ Gengivite	2/1	0/0	2/1	1/1	2/0	2/2
Estomatite caudal	0/0	0/0	2/1	0/0	0/0	0/0
Afecções oftálmicas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	1/1
Linfadenopatia	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Secreções oculares	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Secreções nasais	0/0	1/1	1/0	0/0	0/0	2/0
Mucosas Pálidas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
Pelagem seca/ Seborreia	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Condição corporal	0/1	1/0	0/1	0/0	0/1	1/0
Diarreia	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Doenças secundárias	0/0	1/1	0/1	1/0	0/0	2/2

8.3 Resultados Hematológicos e Proteinograma

O FeLV pode causar alterações hematológicas como a presença de anemia e trombocitopénia (Gleich & Hartmann, 2009). No estudo mencionado anteriormente realizado em 2012 a terapêutica com rFeIFN- ω não induziu alterações no hemograma, uma vez que os valores deste se mantiveram dentro do intervalo de valores de referência ao longo do tratamento.

Durante o tratamento, as concentrações médias de PTs e de globulina- γ apresentaram-se baixas nos gatos FeLV+, mas dentro do intervalo de valores de referência (Gil S. et al, 2012).

8.4 Resultados da expressão de citocinas

Para este estudo, as citocinas foram escolhidas tendo em conta as suas principais funções no sistema imunitário e foram consideradas biomarcadores da resposta imunitária inata ou adquirida. A IL-1, IL-6 e TNF- α são citocinas que estão envolvidas numa resposta imune inata ou seja, sobre estímulos pró-inflamatórios, sendo consideradas como um bom biomarcador da ativação das vias pró-inflamatórias. Por outro lado, a IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10 são principalmente citocinas envolvidas na imunidade adquirida. A IL-12p40 e o IFN- γ são utilizados, neste estudo, como indicadores de uma resposta imunitária via complexo Th1, enquanto que as IL-4 e IL-10 são utilizadas como um bom indicador da resposta imunitária via complexo Th2, uma vez que são citocinas produzidas pelas células Th2. O complexo Th1 promove uma resposta imunitária celular enquanto que o Th2 promove uma resposta imunitária humoral (Kennedy, 2010). Assim, o complexo Th1 atua principalmente contra agentes patogénicos intracelulares, conduzindo à estimulação de células T citotóxicas, células natural killer (NK) e macrófagos (Pedersen, et al., 1998; Tizard, 2009b). Por outro lado, o complexo Th2, induz uma resposta principalmente contra agentes patogénicos extracelulares, através da produção de IL-4, IL-5 e IL-10, que, consequentemente, induzem uma diferenciação das células B (Osborne, Hunter, & Devaney, 1996; Pedersen, et al, 1998; Roitt & Delves, 2001; Romagnani, et al, 1994).

A quantificação relativa revelou níveis sanguíneos muito baixos de todas as citocinas medidas. Apesar de uma tendência geral decrescente, não foram observadas alterações significativas em cada grupo quando se compara a expressão de citocinas antes (D0) e após o tratamento (D65).

2/6 gatos expressam IL1 β , IL6, IL12p40 ao D0 e 3/6 ao D65 (2 decrescem expressão e 1 apresenta valor residual apenas no final do tratamento). 4/6 expressam IL4 ao D0, decrescendo para valores não quantificáveis ao D65. 1/6 expressa TNF α ao D0 e 2/6 ao D65 (1 decresce expressão e 1 apresenta valor residual apenas no final do tratamento). Apenas 1 gato expressou IFN ao D0 e a IL10 ⁽¹⁾ não revelou expressão.

Gráfico 1 e Gráfico 2: Quantificação Relativa da Expressão da IL-1 e IL-4 respectivamente.

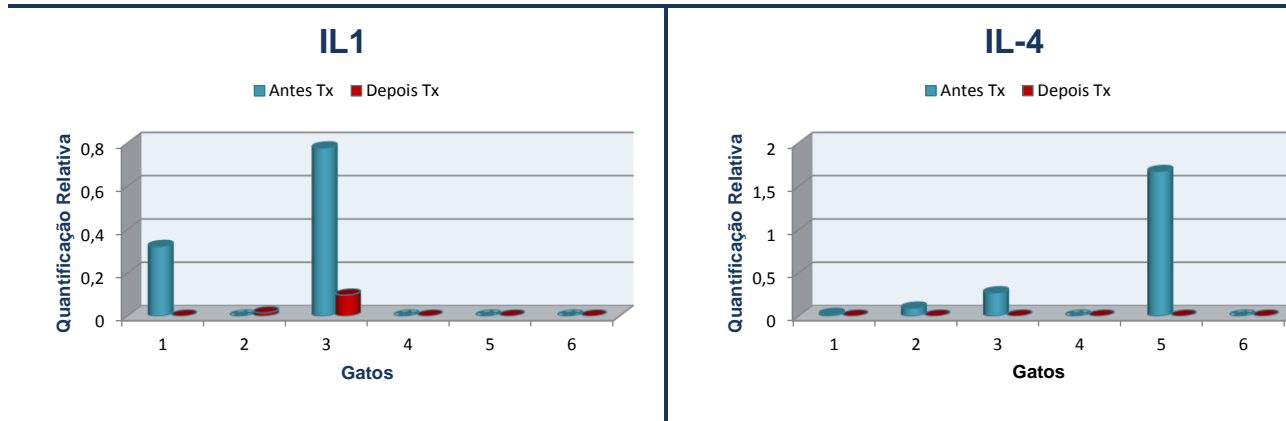


Gráfico 3 e Gráfico 4: Quantificação Relativa da Expressão da IL-6 e IL-12 respectivamente.

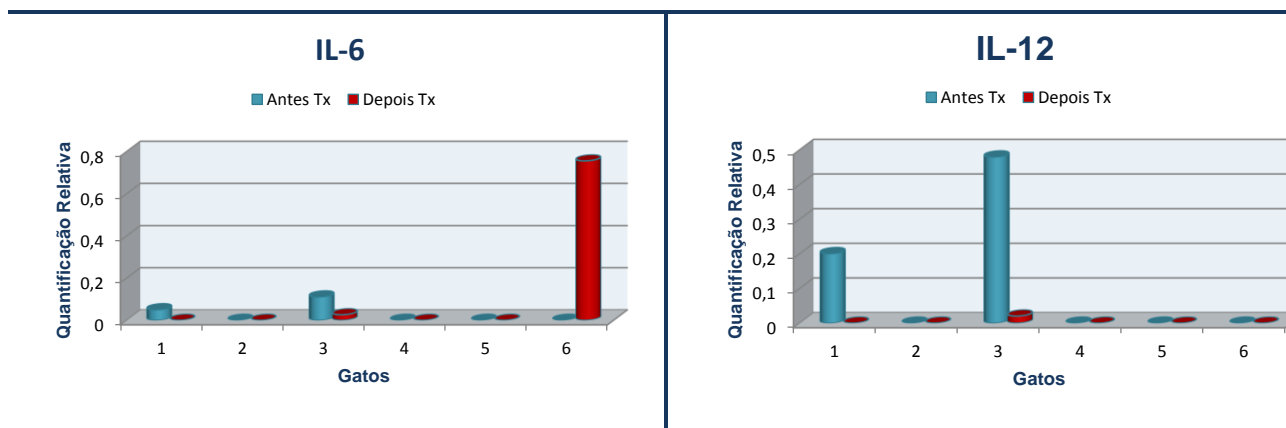
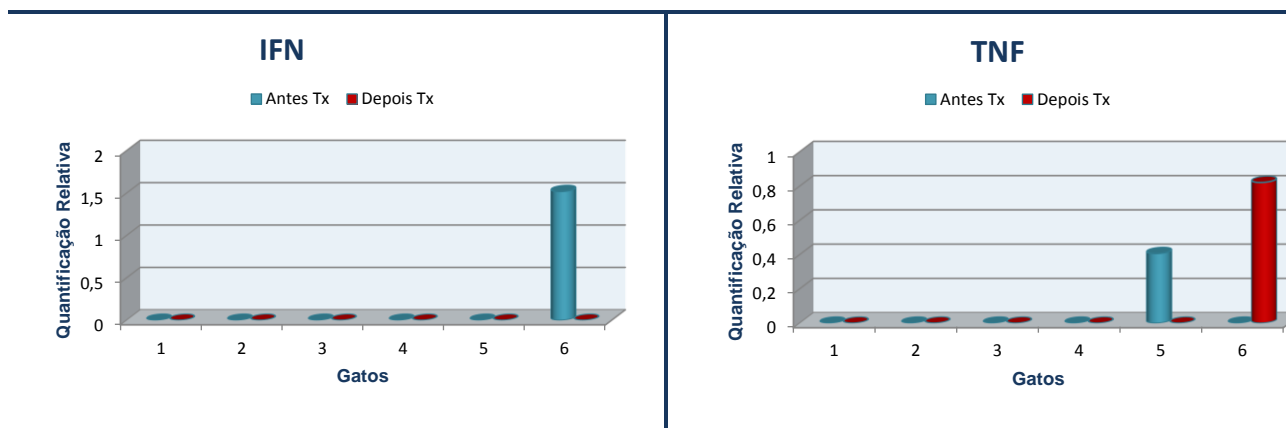


Gráfico 5 e Gráfico 6: Quantificação Relativa da Expressão de IFN e TNF- α respectivamente.



⁽¹⁾ Como a IL10 não revelou expressão, o gráfico referente não é apresentado.

8.5 Resultados proteína Mx

A quantificação relativa não revelou alterações estatisticamente significativas entre a expressão da proteína Mx ao D0 e D65, nem na quantificação do gene ($p = 0,735$ Wilcoxon Signed Rank Test para amostras relacionadas), nem na presença/ausência da expressão do gene ($p = 0,250$ Mc Nemar Teste para amostras relacionadas).

Em 5/5 dos gatos não há expressão da proteína Mx ao dia 0 (antes do tratamento), e apenas 1/5 dos gatos revela uma expressão residual ao dia 65 (depois do tratamento).

Tabela 9: Quantificação da expressão relativa da proteína Mx

Gatos	Mx Dia 0	Mx Dia 65
1	0	0
2	0	0,002277567
3	0	0
4	0	0
5	0	0

9. Discussão

O sistema interferão é a primeira linha de defesa do organismo do hospedeiro contra as infecções virais. Este é libertado por células infectadas mas atua sobretudo nas células que ainda não foram infectadas, levando à alteração da sua fisiologia e interferindo com a replicação viral (Sen, 2001). Existe uma interação complexa entre o FIV ou FeLV e o hospedeiro (Hartmann, 2006), sendo que a imunossupressão induzida por estes vírus leva ao aparecimento de infecções secundárias, de sinais clínicos e de alterações da condição clínica geral que podem causar a morte do animal (de Mari et al., 2004). O desenvolvimento das infecções virais é consequência do balanço entre os mecanismos de evasão viral, nos quais se incluem a via do IFN, e a eficácia do sistema imunitário.

O IFN tipo I (IFN- α , IFN- β e IFN- ω) tem-se mostrado eficaz no tratamento de algumas retroviroses, evidenciando alguns estudos que quando este é utilizado no tratamento de gatos infectados com FIV e/ou FeLV, mostra benefícios na taxa de sobrevivência, na sintomatologia clínica e nos parâmetros hematológicos (Pedretti et al., 2006; de Mari et al., 2004; Doménech et al., 2011; Collado et al., 2007). No estudo de Collado e seus colaboradores em 2007, o objectivo foi estudar o efeito dos vários tipos de interferão do grupo I a nível celular (in vitro), chegando à conclusão que a sua utilização promove um aumento da apoptose nas células infectadas, contribuindo assim para a redução da quantidade de novas partículas virais. Outros estudos verificaram uma melhoria da taxa de sobrevivência, sinais clínicos, parâmetros hematológicos (de Mari et al., 2004; Pedretti et al., 2006; Collado et al., 2007; Doménech et al., 2011) e da carga viral (Pedretti et al., 2006), em gatos tratados com IFN. A carga proviral expressa o número de genomas virais integrados no genoma das células hospedeiras infectadas (Lutz et al., 2009). A diminuição de provírus implica a eliminação das células infectadas (Hosie et al., 2009). O interferão tipo I (IFN- α , IFN- β e IFN- ω) ao ligar-se aos receptores celulares desencadeia uma sequência de acontecimentos que levam à ativação da resposta imunitária (Sen, 2001). As ações do IFN I incluem a redução da velocidade de proliferação da infecção no organismo, a redução das alterações estruturais e funcionais das células infectadas, a indução da ativação de endonucleases que degradam o RNA mensageiro viral e a inativação das proteínas envolvidas na transcrição (Collado et al., 2006). Por outro lado, o IFN também atua ativando células do sistema imunitário, como células natural killer (NK), linfócitos T citotóxicos e macrófagos. Assim esta ativação celular poderá induzir apoptose das células infectadas (Samuel, 2001), contribuindo para a redução da carga de pró-vírus. Num estudo realizado em 2007 concluiu-se que os IFNs (rHuIFN- α e rFeIFN- ω) testados, afectavam o ciclo do FeLV a um nível pós-transcricional, e a

sua aplicação induzia uma pequena ou nula libertação de viriões infecciosos, limitando a disseminação da infecção para outras células do organismo (Collado et al., 2007). Este estudo evidencia também que os IFNs parecem atuar sinergeticamente com o vírus aumentando a apoptose seletiva de células infectadas (Collado et al., 2007).

Em 2011, Doménech e colaboradores concluíram que os animais com uma condição clínica mais avançada no início do tratamento com IFN- ω apresentavam uma melhor resposta à terapêutica. Assim sendo o rFeIFN- ω parece ser eficiente no controlo dos sinais clínicos associados às infecções por FIV e FeLV, melhorando o estado hígido e assim a qualidade de vida dos gatos tratados. Concluíram ainda que o tratamento com rFeIFN- ω não induz alterações na relação CD4/CD8 (Domenech, et al., 2011), e que o aumento relativo de linfócitos e aumento concomitante da carga de pró-vírus, ambos não relacionados com a melhoria dos sinais clínicos observados, são descobertas inesperadas e mais estudos são necessários para relaciona-los com a terapêutica com rFeIFN. Este estudo mostrou também que rFeIFN parece não ter ação sobre a virémia (Domenech, et al., 2011) mostrando os resultados que, de acordo com os Autores anteriores, o rFeIFN não altera os níveis de viremia, independentemente do protocolo terapêutico administrado. No entanto são necessários mais estudos para uma melhor compreensão dos efeitos do IFN na patofisiologia das infecções por FIV e/ou FeLV.

O presente estudo foi executado no sentido de avaliar o protocolo terapêutico com rFeIFN- ω através da expressão de citocinas. O perfil de citocinas foi avaliado através da monitorização da expressão de RNAm de várias citocinas como IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α , sendo esta avaliação baseada em colheitas de sangue obtidas antes e depois de cada protocolo terapêutico.

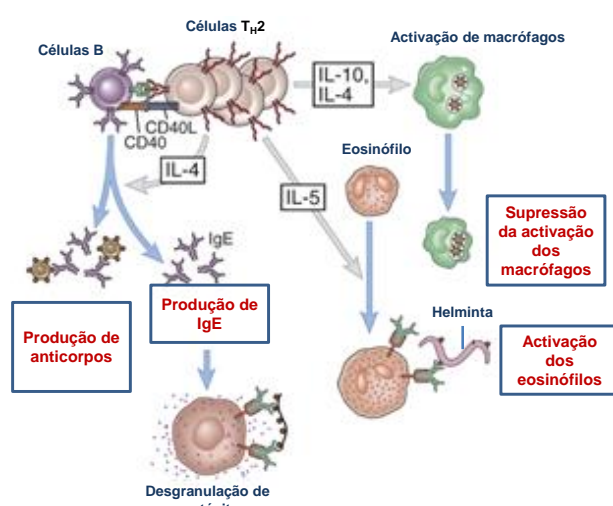
Como mencionado anteriormente o efeito do rFeIFN- ω como antiviral tem sido questionado, acreditando-se que este fármaco atua apenas ao nível da imunidade inata (Domenech, et al., 2011). O aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda, as quais são indicadores indiretos de uma estimulação da imunidade inata simultaneamente com uma melhoria dos sinais clínicos, reforçam esta teoria (RO Leal, et al., 2014). Também foi descrito uma melhoria dos sinais clínicos, com o protocolo rFeIFN- ω oral (Gil et al., 2013), o que leva a concluir que, à semelhança do que foi descrito anteriormente sobre a terapia geral do IFN (Tovey, 2002), estes protocolos devem apresentar diferentes mecanismos de ação. Até à data, nenhum estudo (*in vivo*) sobre a expressão de citocinas em gatos FeLV positivos foi realizado, e nesse sentido estes resultados são particularmente importantes para avaliar o verdadeiro mecanismo de ação do sistema imunitário.

Para este estudo, as citocinas foram escolhidas tendo em conta as suas principais funções no sistema imunitário e foram consideradas biomarcadores da resposta imunitária inata ou adquirida. Apesar do facto de a maioria das citocinas serem pleiotrópicas, podem ser caracterizadas em diferentes padrões de atuação (Roitt & Delves, 2001). Por exemplo, a interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e o Factor de Necrose Tumoral (TNF)- α são citocinas pró-inflamatórias fortemente envolvidas na resposta imune inata, potenciando vias não específicas, tais como a resposta de fase aguda (APR) ou febre (Ceron et al, 2005; Paltrinieri, 2008; Tizard, 2009b). Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-12 (IL-12) e Interferão-gamma (IFN- γ) estão fortemente relacionadas com a ativação do complexo Th1, principalmente contra agentes patogénicos intracelulares, conduzindo à estimulação de células T citotóxicas, células natural killer (NK) e macrófagos (Pedersen, et al., 1998; Tizard, 2009b). Por outro lado, quando o complexo Th2 é ativado, induz uma resposta humoral principalmente contra agentes patogénicos extracelulares, através da produção de IL-4, IL-5 e IL-10, que, consequentemente, induzem uma diferenciação das células B (Osborne, Hunter, & Devaney, 1996; Pedersen, et al, 1998; Roitt & Delves, 2001; Romagnani, et al, 1994).

Em resumo a IL-1, IL-6 e TNF- α são citocinas que estão envolvidas numa resposta imune inata ou seja, sobre estímulos pró-inflamatórios, sendo consideradas como um bom biomarcador da ativação das vias pró-inflamatórias.

Por outro lado, a IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10 são principalmente citocinas envolvidas na imunidade adquirida. A IL-12 é uma citocina heterodimérica composta por duas subunidades (p40 e P35) (Trinchieri, 2003). Neste estudo, a escolha da medição da subunidade IL-12p40 foi devida ao facto de esta ser a única subunidade disponível para medição através do método de ELISA. Sendo assim a IL-12p40 e o IFN- γ são utilizados, neste estudo, como indicadores de uma resposta imunitária via complexo Th1, enquanto que as IL-4 e IL-10 são utilizadas como um bom indicador da resposta imunitária via complexo Th2, uma vez que são citocinas produzidas pelas células Th2. O complexo Th1 promove uma resposta imunitária celular enquanto que o Th2 promove uma resposta imunitária humoral (Kennedy, 2010). Assim, o complexo Th1 atua principalmente contra agentes patogénicos intracelulares, conduzindo à estimulação de células T citotóxicas, células natural killer (NK) e macrófagos, (figura 9) (Pedersen, et al., 1998; Tizard, 2009b). Por outro lado, o complexo Th2, induz uma resposta principalmente contra agentes patogénicos extracelulares, através da produção de IL-4, IL-5 e IL-10, que, consequentemente, induzem uma diferenciação das células B, (figura 10) (Osborne, Hunter, & Devaney, 1996; Pedersen, et al, 1998; Roitt & Delves, 2001; Romagnani, et al, 1994).

Figura 10: Resposta Imunitária via complexo Th2



Os resultados sobre a expressão de citocinas dependem da colheita de sangue e da extração de RNAm, sendo importante referir que a sua medição é difícil uma vez que existem RNAsases que degradam este RNAm circulante (Etheridge, Gomes, Pereira, Galas & Wang, 2013). Além disso, a eficiência de extração do RNAm varia em função do método aplicado e pode ser afetado por diversas variáveis externas, como coágulos de sangue e condições de amostragem (Wong, Lo & Cheung, 2004).

A quantificação relativa revelou níveis muito baixos de todas as citocinas medidas. Apesar de uma tendência geral decrescente, não foram observadas alterações significativas quando se compara a expressão de citocinas antes (D0) e após o tratamento (D65). Considerando os baixos valores obtidos, poder-se-à concluir que as medições de RNAm no sangue parecem não ser tão eficazes como os níveis de plasma ou ainda os estudos *in vitro* que avaliam a resposta imunitária (Robert-Tissot, et al., 2011). Contudo, este é o primeiro estudo que avalia o perfil de citocinas em gatos naturalmente infectados pelo FeLV, levando a novas perspectivas sobre a ação do rFeIFN. Neste sentido esta tendência decrescente nomeadamente da IL-1 e TNF- α demonstra que a via pró-inflamatória da resposta imune inata tende a diminuir com a terapia de rFeIFN- ω . No que diz respeito às citocinas medidas (IL-12p40, IFN- γ), via complexo Th1, nenhuma alteração foi observada o que significa que este caminho parece não ser afetado pela terapêutica com rFeIFN. O mesmo foi observado para quantificação de citocinas (IL-4 e IL-10) via complexo Th2. Enquanto que os resultados da IL-10 não foram detectáveis na maior parte dos animais

estudados, sendo considerada uma citocina insignificante através deste método, a expressão da IL4 permitiu uma quantificação razoável da ativação da via Th2 que, apesar de uma tendência decrescente, manteve-se estável. Portanto, os resultados mostraram que, Th1 e Th2 parecem não ser afetadas pela terapêutica com rFeIFN. Contudo, a tendência decrescente observada pode estar relacionada com a redução de infecções oportunistas. Apesar do efeito do protocolo via oral em infecções oportunistas ser insignificante (Gil, Leal, McGahie, et al., 2013), a terapia SC tem sido relacionada com uma redução significativa de infecções virais simultâneas que podem justificar a ligeira redução observada na expressão do RNAm das citocinas da resposta imunitária Th1 e Th2 .

Embora o efeito antiviral do rFeIFN- ω não seja muito evidente em gatos infectados com FeLV, este estudo ajudou na compreensão do papel deste imunomodulador através do perfil de citocinas. Em resumo, as vias de resposta imunitária adquirida nomeadamente Th1 e Th2 não parecem ser afetados pelo rFeIFN- ω , cuja principal ação parece estar na resposta imunitária inata, reduzindo os estímulos pró-inflamatórios. Esta ação anti-inflamatória pode, em parte, justificar a melhoria clínica observada induzida por este imunomodulador. Este estudo sugere então que apesar do rFeIFN- ω induzir uma melhoria clínica significativa dos animais tratados, a sua ação advém sobretudo de uma estimulação da imunidade inata e não de uma ação direta sob a expressão das citocinas relacionadas com a imunidade adquirida.

A proteína Mx, é considerada como um biomarcador específico do IFN tipo I (Bracklein et al., 2006), possui propriedades antivirais e GTPase específicas, sendo expressa em diferentes células, tais como hepatócitos, células endoteliais e células do sistema imunitário PBMCs, células dendríticas e células mielóides (Fernandez et al, 1999 ; Horisberger et al, 1990; Sadler e Williams, 2008). A produção de proteínas Mx é induzida pelo IFN tipo I após 1-2 horas, atingindo a concentração máxima às 36 horas após a indução de IFN (Ronni et al., 1993). Embora não esteja completamente estudada, entre as suas funções, a proteína Mx está diretamente envolvida no reconhecimento viral, prejudicando a transcrição viral, ligando-se a componentes virais essenciais bloqueando o seu transporte intracelular e controlando diferentes processos tais como exocitose e prevenção da replicação viral numa primeira fase (Haller et al, 2007; Sadler e Williams, 2008; Turan et al, 2004). Devido à sua importância e propriedades anti-virais, a expressão do gene Mx foi avaliada em diferentes condições clínicas, tais como infecções virais, doenças auto-imunes e em casos específicos como terapia com IFN tipo I (Bracklein et al , 2006; Horisberger et al, 1990).

Este estudo descreve o efeito do tratamento com rFeIFN ω através da expressão da proteína Mx em gatos naturalmente infectados com FeLV. Embora a verdadeira função da proteína Mx ainda esteja por esclarecer (Sadler, 2008), acredita-se que esta possui propriedades anti-virais, sendo um biomarcador confiável do IFN tipo I. Considerando que, in vivo, o rFeIFN ω tem mostrado uma atividade anti-viral não muito esclarecedora (Domenech et al., 2011), a medição da proteína Mx pode permitir esclarecer essa função. No entanto neste estudo a quantificação relativa revelou que não há alterações estatisticamente significativas entre a expressão da proteína Mx ao D0 e D65, nem na quantificação do gene ($p = 0,735$ Wilcoxon Signed Rank Test para amostras relacionadas), nem na presença/ausência da expressão do gene ($p = 0,250$ Mc Nemar Teste para amostras relacionadas).

Em 5/5 dos gatos não há expressão da proteína MX ao dia 0 (antes do tratamento), e apenas 1/5 dos gatos revela uma expressão residual ao dia 65 (depois do tratamento).

Estudos anteriores utilizando doses baixas de (200U a 20.000U) indicam que a expressão da proteína Mx (um marcador da resposta biológica do rFeIFN ω) depende da dose de rFeIFN ω , do local de administração, e do tipo de célula (Bracklein et al., 2006). Assim, considerando que a proteína Mx neste estudo parece não aumentar depois do tratamento, não pode ser excluída uma possível inibição da sua expressão quando utilizados protocolos de rFeIFN ω com doses elevadas. Alguns autores defendem que as doses mais elevadas não conseguem induzir a expressão da proteína Mx devido a diferentes mecanismos (Bracklein et al., 2006).

Também é importante referir que o uso de apenas um método para avaliar o efeito da expressão da proteína Mx pode ser considerado como uma limitação do presente estudo. Para além disto este estudo utiliza gatos naturalmente infectados com FeLV, em que o tempo da infecção é desconhecido e a apresentação clínica dos animais é muito variável. Para executar um método de controlo, seria necessário ter animais dentro das mesmas condições biológicas.

Apesar do pequeno número de animais utilizado e as diferentes apresentações clínicas, o estudo revela que a expressão da proteína Mx não parece ser um biomarcador confiável da atividade do rFeIFN ω em gatos sintomáticos naturalmente infectados com FeLV. Contudo mais estudos são necessários para aprofundar estas conclusões sobre a infeção por FeLV e terapêutica com rFeIFN ω .

10. Conclusões Finais

Os resultados neste estudo mostraram que a maioria dos gatos apresentaram uma evolução clínica positiva ao longo da terapêutica com rFeIFN ω , sendo este facto de grande importância para a melhoria da qualidade de vida destes animais, uma vez que estes são muito susceptíveis a infecções secundárias responsáveis pelo declínio do seu estado hígido. A avaliação do efeito terapêutico da aplicação de rFeIFN- ω no combate à infecção pelo FeLV, e os seus efeitos no sistema imunitário, pode ser avaliada pela quantificação da carga viral plasmática, da carga proviral (Doménech et al., 2011) e pela análise da expressão de proteínas inflamatórias e de citocinas produzidas na resposta celular e humoral. No presente estudo foram avaliadas apenas a expressão relativa de citocinas e da proteína Mx. Os resultados evidenciam uma tendência decrescente da expressão das citocinas medidas, embora não se tenham verificado alterações significativas. A quantificação relativa da expressão da proteína Mx também não revelou alterações estatisticamente significativas. Assim, este estudo sugere que apesar do rFeIFN- ω induzir uma melhoria clínica significativa dos animais tratados, a sua acção resulta sobretudo de uma estimulação da imunidade inata e não de uma acção direta sob a expressão de citocinas. Contudo seria necessário a medição destes mediadores nas amígdalas e linfonodos destes animais para uma melhor compreensão e esclarecimento do efeito terapêutico do rFeIFN- ω . No entanto face a estes resultados, é recomendável que gatos infectados por FeLV e com sintomatologia clínica associada sejam tratados com rFeIFN- ω .

BIBLIOGRAFIA

A Moraillon, 2000. Rétroviroses félines. Encyclopédie Vétérinaire. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, Maladies infectieuses, 1500, 2000, 9 p.

Barr M.C. 2006. Feline Immunodeficiency Virus. In: Barr S.C, Bowman D.D (Editors). Canine and feline infectious diseases and parasitology. Ames (USA), Blackwell Publishing, , 213-217.

Bertalogni S. 2008.Traitements antiviraux.Virologie féline : actualités. Dépêche Tech. Vét. n°111, 27-31.

Bertalogni S. 2010. Les traitements antiviraux lors d'affection virale chez le chat. Point Vét. Infectiologie féline, 41,126-132.

Bisset L.R, Lutz H, Böni J, Hofmann-Lehmann R, Lüthy R, Schüpbach J. 2002. Combined effect of Zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. Antivir. Res.,53, 35-45.

Bracklein, T., Theise, S., Metzler, A., Spiess, B.M., Richter, M., 2006. Activity of feline interferon-omega after ocular or oral administration in cats as indicated by Mx protein expression in conjunctival and white blood cells. Am J Vet Res 67, 1025-1032.

Caney S. et al, 2005. Antiviral therapy in cats: current rationale and recommendations. Compan. Anim. Pract, 27, 454-457.

Ceron, J.J, Eckersall, P.D., Martynez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. Vet Clin Pathol 34, 85-99.

Cheng H.H., et al. 2007. Feline leukemia virus T entry is dependent on both expression levels and specific interactions between cofactor and receptor, In: Virology,170- 178.

Cohn, L. A. 2006. Update on feline retroviral infections In: *Proceedings of the International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians*. Rimini, Itália pág: 22-23.

Collado, V.M., Gómez-Lúcia, E., Tejerico, G., Escolar, E., Martin, S. & Doménech, A. 2007. Effect of Type I interferons on the expression of feline leukemia virus. In: Veterinary Microbiology,

Couto, R.W., C.G. (2003). Small Animal Internal Medicine. 3th Ed., Mosby, pág: 1278-1284.

Davis J.L, Papich M.G, Hetm.C, 2009. Antifungal and antiviral drugs, In : Riviere J.E, Papich M.G. (Editors). Veterinary Pharmacology & Therapeutics. 9th ed. Ames (USA), Wiley-Blackwell,1034-1049.

Day, M.J., 2012. Basic Immunology, In: Day, M.J. (Ed.), Clinical immunology of the dog and cat, Second Edition ed. Manson Publishing, London Uk, pp. 11-61.

De Clercq E, 2002. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. Antivir. Res., 55, 1-13.

- De Mari, K., Maynard, L., Sanquer, A., Lebreux, B., Eun, H.M., 2004. Therapeutic effects of recombinant feline interferon- ω on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus(FIV)-coinfected symptomatic cats. In: J Vet Internal Medicine 18, 477-482
- Desenclos M.C. 2010. Utilisation des immunostimulants chez le chien et le chat : synthèse en vue de l'élaboration d'un index thérapeutique, Thèse Méd. Vét., Lyon, n°40, p211.
- Doménech A, Mirò G, Collado V.M, Ballesteros N, Sanjosé L, Ecolar E, et al. 2011. Use of recombinant interferon omega in feline retrovirois : From theory to practice. In: Vet. Immunol. Immunopathol.,143, 301-306.
- Dunham, S.P. & Graham, E., 2008. Retroviral Infections of Small Animals. Veterinary Clinics Small Animal Practice, 38, 879-895.
- Etheridge, A., Gomes, C.P., Pereira, R.W., Galas, D., Wang, K., 2013. The complexity, function and applications of RNA in circulation. Front Genet 4, 115.
- Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 2005. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 6th Ed., Volume 1. Elsevier Saunders, page: 653-662.
- Feline Leukaemia Guideline, European Advisory Board on Cat Diseases ABCD, 2012, [http://abcd-vets.org/guidelines/guidelines_pdf/1201-FeLV_Guideline.pdf].
- Fernandez, M., Quiroga, J.A., Martin, J., Herrero, M., Pardo, M., Horisberger, M.A., Carreno, V., 1999. In vivo and in vitro induction of MxA protein in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus. J Infect Dis 180, 262-267.
- Gil, S., Leal, R.O., Duarte, A., McGahie, D., Sepulveda, N., Siborro, I., Cravo, J., Cartaxeiro, C., Tavares, L.M., 2013. Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. Res Vet Sci 94, 753-763.
- Gingerich D.A. 2008. Lymphocyte T-Cell Immunomodulator (LTCI): Review of the Immunopharmacology of a New Veterinary Biologic. Int. J. Appl. Res. Vet. Med., 6, 61-68.
- Gomes-Keller, M.A., Tandon, R., Gönczi, E., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. 2006. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. In: Veterinary Microbiology, 112, 11-21.
- Greene, C.E. (2012). Infectious diseases of the dog and cat. (4th ed.). Missouri: WB Saunders Co.
- Haller, O., Kochs, G., Weber, F., 2007. Interferon, Mx, and viral countermeasures. Cytokine Growth Factor Rev 18, 425-433.
- Hardy, W-D et al. 1976. Biology of the feline leukemia virus in the natural environment. In: *Cancer research*, 36, 582-588.

- Hardy, W-D Jr. 1981. The feline leukemia virus. In: *Journal of the American Animal Hospital Association*, 17, 951-980.
- Hardy, W-D Jr. 1983. Naturally occurring retroviruses (RNA tumor viruses). In: *Cancer investigation*, 1, 67-83.
- Hartmann, K. 2004. Feline Leukemia Virus Infection In: *Veterinary Interferon Handbook*, 1^a Ed, Virbac S.A. pág: 35-68.
- Hartmann K, 2005. Feline Infectious Peritonitis. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, 35, 39-79
- Hartmann, K. 2006. Feline Leukemia Virus Infection. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat* , Revised Reprint, 3rd ed., pp. 105-131. St Louis, Missouri: Saunders.
- Hartmann K, Stengel K.C, Klein D, Egberink H, Balzarini J, 2012. Efficacy and Adverse Effects of the Antiviral Compound Plerixafor in Feline Immunodeficiency Virus-Infected Cats. *J. Vet. Intern. Med.*, 26, 483-490.
- Hoffmann-Fezer, G.; Mortelbauer, W.; Hartmann, K.; Mysliwietz, J.; Thefeld, S.; Beer, B.; Thum, I.; Kraft, W. 1996. Comparison of t-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. In: *Res Vet Sci*, 61, 222-226.
- Hofmann-Lehmann, R.; Huder, J.B.; Gruber, S.; Boretti, F.; Sigrist, B.; Lutz, H. 2001. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. In: *J Gen Virol*, 82, 1589-1596.
- Hofmann-Lehmann R, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Willi B, Cattori V, et al. 2006. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays, *Vaccine*, 24, 1087–1094.
- Hohenhaus, A-E. 2005. Myelodysplastic Syndromes. In: *NAVC*. Orlando, Florida,. 388-389.
- Horzinek, M., Addie, D., Bélak, S. *et al.* 2007. Guidelines on Feline Infections Disease - Feline Leukaemia Virus, ABCD European Advisory Board on Cats Diseases.
- Horisberger, M.A., Schrenk, R., Staiger, S., Leyvraz, A.R., Martinod, S., 1990. Induction of Mx-related protein in cat peripheral blood mononuclear cells after administration of recombinant human interferon hybrid. *Antiviral Res* 13, 53-59.
- Hosie M.J, Frymus T. et al. 2007. ABCD Guidelines on Feline Leukemia Virus. *European advisory board on cat diseases*.
- Huisman, W., Karlas, J.A., Siebelink, K.H.J. *et al.* 1998. Feline immunodeficiency virus subunit vaccines that induce virus neutralizing antibodies but no protection against challenge infection In: *Vaccine*, 16: 181-187.
- Jacquemin, P-C et al. 1978. Antibody response in cats to Feline Leukemia Virus reverse transcriptase under natural conditions of exposure to the virus. In: *Virology*, 91, 472-476.
- Jarrett, O. 1999. Strategies of retrovirus survival in the cat In: *Veterinary Microbiology*, 69: 99-

Kahn, C.M. 2007. Manual MERK de Veterinária. Volume 1. 6ª Ed. Oceano/ Centrum Merial, pág: 620-624, 651- 652,1337-1338.

Kennedy, M.A., 2010. A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40, 369-379.

Kirpensteijn, J., 2006. Feline injection site-associated sarcoma: is it a reason to critically evaluate our vaccination policies. *Veterinary Microbiology*, 117(1), 59–65.

Kolenda-Roberts H.M, Kuhnt L.A, Jennings R.N, Mergia A, Gengozian N, Johnson C.M., 2008. Immunopathogenesis of feline immunodeficiency virus infection in the fetal and neonatal cat. *Front Biosci.*12, 3668-3682.

Lee J.K, Lee M.K, Yun Y.P, Kim J.S, Kim K, Han S.S, Lee C.K. 2001. Acemannan purified from Aloe Vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.*,1, 1275-1284.

Levy D.E, Marie I.J, Durbin J.E, 2011. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol*,1, 476-486.

Levy, J., Crawford P-C., S-J, Feldmann, E-C Ettinger, 2000. Feline leukemia virus. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th edition, 653-659. Philadelphia: WB Saunders Compagny.

Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K. *et al.* 2008. American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines In: *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10: 300-316.

Levy, L. *et al* 2008. Advances in understanding molecular determinants. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology*,: 14-22.

Levy J, Crawford C, Hartmann K, Hoffmann-Lehmann R, Little S, Sundahl E, Thayer V, 2009 Feline Retrovirus Management Guidelines. In: *Feline Focus. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 31,264-273.

Linenberger, M.L., Abkowitz, J.L. 1995. Haematological disorders associated with feline retrovirus infections In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 8: 73-101.

Linenberger, M.L., Deng,T. 1999. The effects of feline retroviruses on cytokine expression In:*Veterinary Immunology and Immunopathology* 72: 343-368.

Little S.E, Kennedy M. Infectious Disease, 2012. Viral Disease. The Cat, Clinical medicine and management. In: Little SE, Editor Saint Louis, Elsevier Saunders., 1029-1070

Lutz H., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hartmann K., Hosie M.J., Lloret A., Marsilio F., Pennisi M.G., Radford A.D., Thiry E., Truyen U., Horzinek M.C, 2013. Prevention of infectious diseases in cat shelters: ABCD guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11: 565.

Lutz, H. *et al* 2007. Fighting and Managing Feline Retrovirus Disease In: *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA*. Barcelona, Espanha.

- Mullins, J-L, Hoover, E-A. 1989. Molecular aspects of feline leukemia virus pathogenesis. *Retrovirus biology and human disease*, 87-116.
- Neil, J.C. 2008. Feline Leukemia and Sarcoma Viruses In: *Encyclopedia of Virology*. 3^aEd. Pag. 185-190. Elsevier
- Ogilvie GK, Tompkins MB, Tompkins WA, 1988. Clinical and immunologic aspects of FeLV-induced immunosuppression. In: *Veterinary Microbiology*;17(3):287- 96
- Osborne, J., Hunter, S.J., Devaney, E., 1996. Anti-interleukin-4 modulation of the Th2 polarized response to the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *Infect Immun* 64, 3461-3466.
- Overbaugh, J.; Donahue, P.R.; Quackenbush, S.L.; Hoover, E.A.; Mullins, J.I. 1988. Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. In: *Science*, 239, 906-910.
- Paltrinieri S, Crippa A, Comerio T, Angioletti A, Roccabianca P. 2007. Evaluation of inflammation and immunity in cats with spontaneous parvovirus infection : Consequences of recombinant feline interferon- ω administration. In: *Vet. Immunol. Immunopathol.*,118, 68-74.
- Paltrinieri, S., 2008. The feline acute phase reaction. *Vet J* 177, 26-35
- Pedersen, N.C., Dean, G.A., Bernales, J., Sukura, A., Higgins, J., 1998. *Listeria monocytogenes* and *serratia marcescens* infections as models for Th1/Th2 immunity in laboratory cats. *Vet Immunol Immunopathol* 63, 83-103.
- Pepin, A.C.; Tandon, R.; Cattori, V.; Niederer, E.; Riond, B.; Willi, B.; Lutz, H.; Hofmann-Lehmann, R. 2007. Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral RNA in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. In: *Virus Res*, 127, 9-16.
- Petit S, Richard N, Médard F.H, et al. 2012. *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des produits de santé animale (DMV)*, 17^{ème} éd., Rueil-Malmaison, Éditions Le Point Vétérinaire, 2304p.
- Plumb D.C. 2008. *Plumb's Veterinary drug handbook*. 6th ed. Ames, USA, Blackwell Publishing, 1120p.
- Polas PJ, Swenson CL, Sams R, Cheney CM, Hayes KA, Tarr MJ, et al. 1990. In vitro and In vivo Evidence that the Antiviral Activity of 2',3'-Dideoxycytidine Is Target Cell Dependant in a Feline Retrovirus Animal Model, *Antimicrob. Agents Ch.*,34, 1414-1421.
- Quackenbush, S.L.; Donahue, P.R.; Dean, G.A.; Myles, M.H.; Ackley, C.D.; Cooper, M.D.; Mullins, J.I.; Hoover, E.A. 1990. Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus felv-faids. In: *J Virol*, 64, 5465-5474.
- Roitt, I.M., Delves, P.J., 2001. The production of effectors, In: Roitt, I.M., Delves, P.J.(Eds), *Essential Immunology*, Tenth Edition ed. Blackwell Publishing, Massachussets pp.147-164.
- Rojko J.L., Olsen R.G. 1984. The immunobiology of the feline leukaemia virus. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 6,: 107-165.

- Rojko J.L., Kociba G.J. 1991. Pathogenesis of infection by the Feline Leukaemia Virus. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 199,1305-1310.
- Romagnani S, Del Prete G, Manetti R, Ravina A, Annunziato F, De Carli M, Mazzetti M, Piccinni MP, D'Elia MM, Parronchi P, et al., 1994. Role of TH1/TH2 cytokines in HIV infection. *Immunol Rev* 140, 73-92.
- Ronni, T., Melen, K., Malygin, A., Julkunen, I., 1993. Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells. *J Immunol* 150, 1715-1726.
- Sadler, A.J., Williams, B.R., 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8, 559-568.
- Sen, G.C. 2001. Viruses and interferons. *The Annual Review of Microbiology*, 55: 255-81.
- Shukla A.K, Pinard C.L. 2012. Feline Uveitis. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 34(9), E1- E9.
- Siméon L.A, Mercier P, Mazière P, Bongrain G. 2009. Panleucopénie féline aiguë : à propos d'un cas traité avec succès par l'interféron- ω . *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 44, 125-131.
- Sykes, J. 2009. Infectious causes of anemia in cats. In: *Veterinary Focus*, 19, 2, 31- 40.
- Sykes J. E., 2010. Immunodeficiencies caused by infectious diseases. In: *Vet Clinic Small Animal*, 409-423.
- Tavares, L.; Ronecker, C.; Johnston, K.; Lehrman, S.N. and Noronha, 1987, F.- 3' Azido 3' Deoxythymidine in FeLV infected Cats: A model for therapy and prophylaxis of AIDS - *Cancer Research* 47: 3190-3194.
- Thacker E.L. 2010. Immunomodulators, Immunostimulants and Immunotherapies. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 40, 473-483
- Thiry E. Maladies Virales du Chat. In: *Virologie clinique du chien et du chat. Collection Virologie clinique. Maisons-Alfort, Éditions Le Point vétérinaire*, 2002, 89-180
- Tizard, I.R., 2009. Helper T cells and their response to antigen, In: Tizard, I.R. (Ed.), *Veterinary Immunology: an introduction*, Eighth Edition ed. Saunders Elsevier, Missouri, pp. 139-152.
- Torres, A.N.; Mathiason, C.K.; Hoover, E.A. 2005. Re-examination of feline leukemia virus: Host relationships using real-time pcr. In: *Virology*, 332, 272-283.
- Tovey, M.G., 2002. Oromucosal cytokine therapy: mechanism(s) of action. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 8, 125-131.
- Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., Saito, S., Numajiri, A., Nagata, K., 2004. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* 32, 643-652.
- Willett B. J., Hosie M. J. 2012. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. In: *The Veterinary Journal*, 16-23.

Wong, S.C., Lo, E.S., Cheung, M.T., 2004. An optimized protocol for the extraction of non-viral mRNA from human plasma frozen for three years. J Clin Pathol 57, 766-768.

Yates KM, Rosenberg LJ, Harris CK, Bronstad DC, King GK, Biehle GA, et al. 1992. Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus. Vet. Immun. Immunopathol.,35, 177-189.

Zylexis. WebSite do laboratório Zoetis, 2014, (<https://online.zoetis.com/US/EN/Products/Pages/Zylexis.aspx>) (consultado dia 02 Fevereiro de 2014)

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOQUINAS EM GATOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV) TRATADOS COM INTERFERÃO ÔMEGA RECOMBINANTE FELINO (rFeIFN- ω).

S. Siraço¹, R. Leal¹, S. Gil¹, L. Tavares¹

1- Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal/ Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa, Portugal.

INTRODUÇÃO

O interferão ômega felino (rFeIFN- ω) é actualmente o único interferão licenciado para uso médico-veterinário tendo-se mostrado eficaz no tratamento de gatos infectados pelo FeLV: melhora o seu estado clínico, prolonga a sua longevidade e reduz a excreção de vírus concomitantes. Contudo, o efeito do rFeIFN- ω como antiviral tem sido questionado, acreditando-se que este fármaco actue apenas ao nível da imunidade inata. Resultados publicados pelo nosso grupo reforçam esta teoria, reportando um aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda, indicadores indirectos de uma estimulação da imunidade inata.

OBJECTIVOS

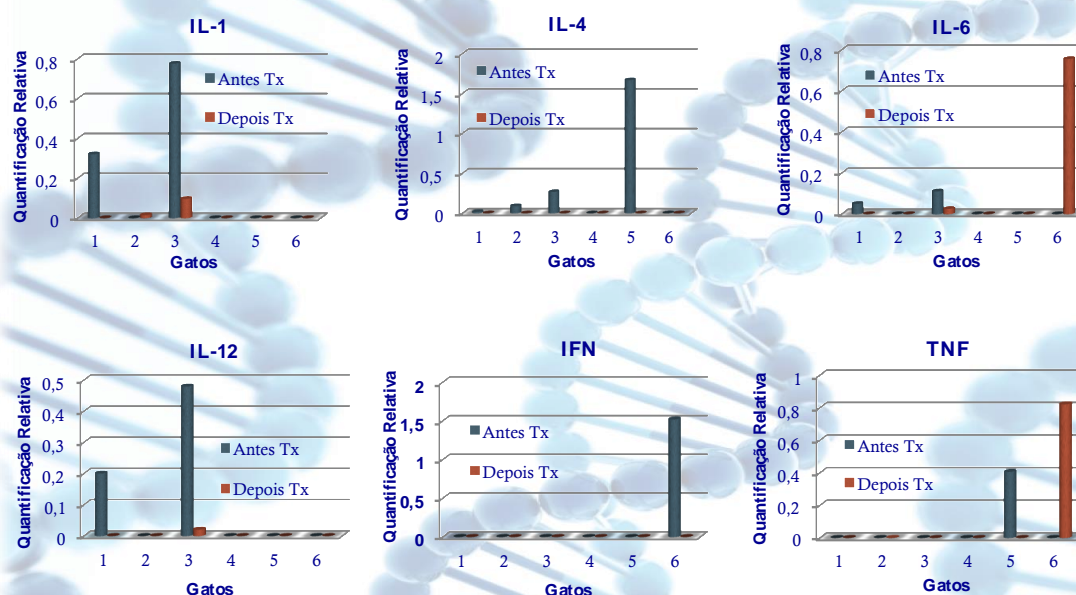
Com vista a clarificar as propriedades imunomoduladoras do rFeIFN- ω , este estudo visa avaliar o efeito deste fármaco na expressão de diferentes citocinas (IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL12p40, IFN e TNF α) em gatos naturalmente infectados com FeLV.

MATERIAIS E MÉTODOS

6 gatos FeLV-positivos foram tratados com rFeIFN- ω segundo o protocolo licenciado (3 ciclos de 5 injeções subcutâneas 1MU/kg aos dias 0, 14, 60). Antes do início do tratamento (D0) e no seu término (D65), os animais foram sujeitos a colheitas de sangue para avaliação da expressão relativa de citocinas por PCR em tempo real.

RESULTADOS

2/6 gatos expressam IL1 β , IL6, IL12p40 ao D0 e 3/6 ao D65 (2 decrescem expressão e 1 apresenta valor residual apenas no final do tratamento). 4/6 expressam IL4 ao D0, decrescendo para valores não quantificáveis ao D65. 1/6 expressa TNF α ao D0 e 2/6 ao D65 (1 decresce expressão e 1 apresenta valor residual apenas no final do tratamento). Apenas 1 gato expressou IFN ao D0 e a IL10 não revelou expressão.



DISCUSSÃO

Comparando o D0 com o D65, não se verificaram alterações significativas da expressão das citocinas medidas, apesar de uma tendência decrescente das mesmas. Este estudo sugere que apesar do rFeIFN- ω induzir uma melhoria clínica significativa dos animais tratados, a sua acção advém sobretudo de uma estimulação da imunidade inata e não de uma acção directa sobre a expressão de citocinas.